

**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E  
SPERIMENTALE**

**XXV Ciclo**

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3 MALATTIE DEL SANGUE, ONCOLOGIA E REUMATOLOGIA  
Settore Scientifico disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

**CARATTERIZZAZIONE CITOGENETICO-MOLECOLARE  
DELLE ALTERAZIONI CROMOSOMICHE 3q26 e 1p36  
NELLE SINDROMI MIELOPROLIFERATIVE**

Presentata da: Dott.ssa CARMEN BALDAZZI

Coordinatore Dottorato  
Chiar.mo Prof. Stefano Pileri

Relatore  
Dott.ssa Nicoletta Testoni

# INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 I disordini mieloproliferativi .....	4
1.2 Leucemia acuta mieloide (LAM) .....	5
1.2.1 Epidemiologia.....	5
1.2.2 Classificazione .....	6
1.2.2.1 Classificazione FAB.....	6
1.2.2.2 Classificazione WHO .....	8
1.2.3 Citogenetica .....	9
1.2.4 Prognosi .....	12
1.2.4.1 Citogenetica e prognosi.....	13
1.3 Sindromi mielodisplastiche (SMD).....	15
1.3.1 Classificazione .....	16
1.3.2 Citogenetica .....	17
1.3.3 Prognosi .....	18
1.4 Alterazioni delle regioni cromosomiche 3q21 e 3q26 .....	20
1.4.1 Struttura del gene EVI1 e relativa proteina codificata .....	22
1.4.2 Riarrangiamenti di EVI1 .....	25
1.4.2.1 inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2).....	26
1.4.2.2 t(3;21)(q26;q22) .....	29
1.4.2.3 t(3;12)(q26;q21) .....	30
1.4.3 Espressione di EVI1 e leucemogenesi .....	31
1.4.3.1 Espressione differenziale di MDS1-EVI1 e EVI1.....	33
1.5 Alterazioni della regione cromosomica 1p36.....	34
1.5.1. Struttura del gene PRDM16 e relativa proteina codificata .....	35
1.5.2 Riarrangiamenti di PRDM16 .....	37
1.5.2.1 t(1;3)(p36;q21) .....	38
1.5.2.2 t(1;21)(p36;q22) .....	40
1.5.3 Espressione di PRDM16 e leucemogenesi.....	41
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO .....	43
3. MATERIALI E METODI.....	44

3.1 Casistica .....	44
3.2 Analisi citogenetica convenzionale .....	45
3.3 Tecnica di bandeggio cromosomico .....	46
3.3.1 Bandeggio GAW.....	46
3.4 Analisi in FISH.....	47
3.4.1 Sonde utilizzate.....	47
3.5 Analisi di espressione genica.....	55
3.5.1 Separazione su Ficoll .....	55
3.5.2 Estrazione di DNA e RNA.....	55
3.5.3 Sintesi del cDNA .....	56
3.5.4. Metodica di RQ-PCR.....	57
3.6. Analisi statistiche .....	61
4.RISULTATI .....	62
4.1 Analisi citogenetica convenzionale .....	62
4.1.1 Frequenza alterazioni citogenetiche nelle LAM .....	62
4.1.2 Alterazioni del braccio 3q .....	65
4.1.3 Alterazioni del braccio 1p .....	66
4.1.4 Alterazioni del cromosoma 7 .....	66
4.2 Riarrangiamenti di EVI1 .....	67
2.1 FISH interfase (I-FISH) .....	67
4.2.2 FISH metafase.....	68
4.2.3 Espressione di EVI1 .....	72
4.2.4. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti.....	74
4.3 Riarrangiamenti di PRDM16.....	76
4.3.1 FISH.....	76
4.3.2 Espressione di PRDM16 .....	79
4.3.3 Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti.....	81
4.4 Espressione di PRDM16 ed EVI1 in LAM-CN .....	83
5. DISCUSSIONE.....	85
6. BIBLIOGRAFIA.....	96

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 I disordini mieloproliferativi*

I disordini mieloproliferativi costituiscono un gruppo di malattie ematologiche caratterizzate da un'anomala proliferazione di cellule, mature o immature, di una o più linee cellulari emopoietiche della linea mieloide. Le sindromi mieloproliferative si possono a loro volta distinguere in acute, subacute e croniche. Questa distinzione ha basi storiche e cliniche, che si riferiscono al decorso e alla durata delle diverse malattie, ma che corrisponde anche a caratteristiche biologiche differenti. Le sindromi mieloproliferative croniche (SMC) sono caratterizzate da un'eccessiva proliferazione delle cellule del clone neoplastico che mantengono la capacità differenziativa e maturativa delle loro controparti normali. Le sindromi mieloproliferative acute invece sono caratterizzate da un difetto di maturazione delle cellule leucemiche che provoca uno squilibrio fra proliferazione e differenziamento causando una continua espansione e accumulo di cellule blastiche mieloidi con difettiva produzione di granulociti, monociti, piastrine ed eritrociti. Le sindromi mieloproliferative subacute o sindromi mielodisplastiche (SMD) rappresentano un gruppo eterogeneo di malattie in cui predomina un difetto maturativo di una o più linee emopoietiche con conseguente emopoiesi inefficace di vario grado [1].

## ***1.2 Leucemia acuta mieloide (LAM)***

La leucemia acuta mieloide (LAM) comprende un gruppo di patologie neoplastiche che hanno origine da una cellula staminale, pluripotente o multipotente, già orientata in senso mieloide. La trasformazione neoplastica altera i meccanismi che regolano la proliferazione e la differenziazione della cellula staminale colpita, impedendo la maturazione della sua progenie. La conseguenza è primariamente l'accumulo nel midollo osseo e quindi nel sangue periferico e in altri organi e tessuti, di cellule blastiche che proliferano in maniera incontrollata in modo che acquisiscono più o meno rapidamente una netta prevalenza rispetto ai cloni dell'emopoiesi normale [1].

### **1.2.1 Epidemiologia**

Le LAM insorgono a ogni età, ma la loro frequenza aumenta considerevolmente con l'età (l'età mediana è compresa tra i 60 e 65 anni). La distribuzione e la frequenza delle LAM in diverse aree geografiche e popolazioni varia sostanzialmente, sia per fattori genetici sia ambientali. Infatti, l'esposizione professionale o iatrogena ad agenti potenzialmente leucemogeni aumenta significativamente le probabilità di ammalarsi di LAM. Le LAM si possono distinguere in: LAM "primarie" o "*de novo*" che compaiono in soggetti non precedentemente esposti ad agenti leucemogeni, LAM "secondarie ad esposizione ad agenti leucemogeni", infine LAM "secondarie ad una precedente sindrome mielodisplastica" della quale costituiscono l'evoluzione [1].

### **1.2.2 Classificazione**

Le due principali classificazioni che vengono comunemente utilizzate per classificare le LAM sono:

- FAB (French-American British) [2,3]
- WHO (World Health Organization) [4,5,6]

Entrambe le classificazioni prendono in considerazione differenti caratteristiche delle cellule neoplastiche per stabilire la linea differenziativa ed il grado di maturazione delle cellule stesse. Recentemente, altre caratteristiche hanno dimostrato avere un ruolo fondamentale per il comportamento clinico di queste patologie, come particolari caratteristiche citogenetiche, genetico-molecolari e/o precedenti terapie e mielodisplasie. La classificazione WHO cerca di integrare tutti gli aspetti rilevanti di una LAM, per ottenere una classificazione più specifica.

#### **1.2.2.1 Classificazione FAB**

Il sistema classificativo storico delle LAM si basa su criteri morfologici mediante l'osservazione microscopica di strisci di sangue periferico e di midollo osseo, e su criteri citochimici mediante l'analisi di attività enzimatiche e/o presenza di particolari sostanze (mieloperossidasi, sudan-black, fosfatasi acida etc.) sui blasti leucemici.

Questa classificazione, i cui criteri furono stabiliti nel 1976 dal gruppo FAB (Gruppo Cooperatore Francese-Americano-Britannico) [2], identifica differenti sottotipi di LAM in base alla linea differenziativa della popolazione leucemica ed

alla completa o parziale soppressione della capacità maturativa del clone neoplastico (Tab.1).

<b>FAB</b>	<b>Nome comune</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Isto- chimica</b>	<b>Immuno- fenotipo</b>
<b>M0</b>	INDIFFERENZIATA	Cellule senza maturazione citologica	MP-	CD13,CD 33
<b>M1</b>	MIELOBLASTICA Senza maturazione	Blasti >90%, 10% di cellule in maturazione a granulociti o monociti.	MP+	CD13,CD33, MPO7, (CD14)
<b>M2</b>	MIELOBLASTICA con maturazione	Blasti 30-90% granulociti in maturazione >10% cellule monocitiche <20%	MP+	CD13,CD33, MPO7,
<b>M3</b>	PROMIELOCITICA Tipica	promielociti ipergranulari anormali. Corpi di Auer presenti.	MP+	CD13,CD33, MPO7,
<b>M3v</b>	PROMIELOCITICA Microgranulare	Promielociti con piccoli granuli citoplasmatici.	MP+	CD13,CD33, MPO7,
<b>M4</b>	MIELO- MONOBLASTICA	Blasti >30%, cellule del lineage monocitico>20% ma <80%	MP+,NSE+	CD13,CD33, CD14
<b>M5a</b>	MONOBLASTICA Senza maturazione	>80% delle cellule monocitiche sono monoblasti	NSE+	CD14,CD13, CD33
<b>M5b</b>	MONOBLASTICA Con maturazione	<80% delle cellule monocitiche sono monoblasti	NSE+	CD14,CD13, CD33
<b>M6</b>	ERITROBLASTICA	eritroblasti >50% , e blasti >30% cellule non-eritroidi	Eritroblasti PAS+	CD42
<b>M7</b>	MEGACARIOBLASTICA	megacarioblasti >30% cellule non-eritroidi. Mielofibrosi.	piastrine perox +	CD41
Note: MP: mieloperossidasi; NSE: esterasi non specifica; PAS: Periodic acid-Schiff.				

**Tabella 1. Sintesi della classificazione FAB delle LAM**

### 1.2.2.2 Classificazione WHO

Nel 1998 è stata proposta una nuova classificazione delle malattie neoplastiche del tessuto emopoietico e linfoide: la classificazione WHO, che integra i parametri morfologici, immunofenotipici, con le caratteristiche citogenetiche [4]. Dal 1999 la classificazione WHO è stata oggetto di continue modifiche, riflettendole nuove acquisizioni in campo genetico e clinico, che hanno permesso di introdurre nuove categorie definite da alterazioni citogenetiche e molecolari [5,6]. La nuova classificazione WHO del 2008 [6] comprende 4 principali categorie di LAM: (i) LAM con alterazioni genetiche ricorrenti; (ii) LAM con displasia multilineare; (iii) LAM correlate a terapia; (iiii) LAM non altrimenti specificate (Tab.2).

<b><u>(i) Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities</u></b>
AML with t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>
AML with t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EV11</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKLI</i>
Provisional entity: AML with mutated <i>NPM1</i>
Provisional entity: AML with mutated <i>CEBPA</i>
<b><u>(ii) Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes</u></b>
<b><u>(iii) Therapy-related myeloid neoplasms</u></b>
<b><u>(iiii) Acute myeloid leukemia, not otherwise specified</u></b>
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia Pure
erythroid leukemia
Erythroleukemia,
erythroid/myeloid Acute
megakaryoblastic leukemia Acute
basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
Blasticplasmacytoid dendritic cell neoplasm

**Tabella 2. Classificazione WHO delle LAM**



### 1.2.3 Citogenetica

Le LAM sono caratterizzate da un'elevata eterogeneità genetica dimostrata dall'osservazione di numerose differenti alterazioni cromosomiche strutturali e numeriche, che contribuiscono in maniera fondamentale alla leucemogenesi. Attraverso l'identificazione dei precisi breakpoints, la citogenetica ha permesso l'individuazione di molti geni che contribuiscono al processo neoplastico. Successivamente la caratterizzazione di questi geni ha rivelato come essi siano spesso coinvolti direttamente o indirettamente nello sviluppo e nella omeostasi del sistema emopoietico. Questo ha contribuito all'individuazione di terapie mirate all'alterazione genetica, come nel caso della t(15;17)(q22;q21) nella leucemia promielocitica e t(9;22)(q34;q11) nella leucemia mieloide cronica, con miglioramento nella prognosi e aspettativa di vita [7]. Alterazioni cromosomiche clonali si riscontrano in circa il 55% degli adulti con LAM, alcune di queste alterazioni sono molto rare, mentre altre occorrono con una maggiore frequenza (Tab.3) [8-10].

Le LAM possono essere suddivise in principali gruppi citogenetici, quali: (1) LAM a cariotipo normale (LAM-CN) osservato nel ~40-45% dei casi; (2) LAM con una traslocazione primaria (es. t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13;q22), t(8;21)(q22;q22), t(9;11)(p23;q23), etc.) nel ~20-25% dei casi; (3) LAM con alterazioni sbilanciate in assenza di una traslocazione bilanciata nota, caratterizzate da perdita o acquisizione di ampie regioni riscontrato nel ~35-40% dei pazienti. Circa il 50% dei pazienti dell'ultimo gruppo presenta un cariotipo complesso ( $\geq 3$  alterazioni nello stesso clone) [11].

Alterazione citogenetica	Geni coinvolti	Associazione morfologia	Incidenza*
<b>Traslocazioni/inversioni</b>			
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1	M2	6-7%
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	CBFB-MYH11	M4Eo	5-7%
t(15;17)(q22;q21)	PML-RARA $\alpha$	M3	7-13%
t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	M5	1-2%
t(6;11)(q27;q23)	MLL-AF6	M4 e M5	0.5-1%
inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)	RPN1-EVI1	M1,M4,M6,M7?	~1%
t(6;9)(p23;q34)	DEK-NUP214	M2,M4	~1%
<b>Sbilanciamenti cromosomici</b>			
+8	?	M2, M4, e M5	9-10%
-7/7q-	?	Nessuna preferenza	7-8%
-5/5q-	?	Nessuna preferenza	5-7%
-17/17p-	TP53	Nessuna preferenza	4-5%
-20/20q-	?	Nessuna preferenza	2-3%
9q-	?	Nessuna preferenza	2-3%
+22	?	M4, M4Eo	2-3%
+21	?	Nessuna preferenza	2-3%
+13	?	M0, M1	2%
+11	MLL	M1, M2	1-2%
<b>Cariotipo complesso **</b>			10-14%
<b>Cariotipo normale</b>			41-44%

**Tabella 3. Frequenti alterazioni cromosomiche nelle LAM.** \*frequenza determinata da studi su LAM “*de novo*”[9],[10] \*\*definito come  $\geq 3$  alterazioni in assenza di t(8;21), inv(16)/t(16;16), t(15;17) o t(9;11).

La frequenza di alcune alterazioni è correlata all'età dei pazienti, riflettendo probabilmente diversi meccanismi patogenetici. Pazienti con traslocazioni bilanciate tendono ad essere più giovani, mentre cariotipi complessi occorrono di solito ad una età più avanzata. I risultati di diversi studi hanno illustrato due differenti profili in base all'età da un punto di vista citogenetico, il primo è rappresentato da una frequenza piuttosto costante di alterazioni bilanciate durante la vita, mentre le alterazioni sbilanciate e i cariotipi complessi mostrano un forte aumento con l'avanzare dell'età [11]. È possibile che alcuni meccanismi come una difettiva capacità di riparazione delle rotture a doppio filamento e sbilanciamenti nella distribuzione dei cromosomi durante la mitosi, portino alla formazione di alterazioni non bilanciate. Questi meccanismi avvengono più frequentemente nelle

cellule senescenti, più suscettibili ad acquisire tali alterazioni dovute all'accorciamento dei telomeri ed una meno efficiente capacità di riparazione del DNA [11]. Oggi la citogenetica convenzionale (CC) rappresenta una caratterizzazione indispensabile nella diagnosi delle LAM, mentre l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), può essere utilizzata in aggiunta alla CC in casi di alterazioni cromosomiche non immediatamente identificabili (ad es: inv(16), t(15;17), traslocazioni coinvolgenti la regione 11q23 o riarrangiamenti della regione 3q26), soprattutto in presenza di una qualità sub-ottimale dei preparati. Inoltre, la FISH è fondamentale per identificare i riarrangiamenti "criptici", che possono coinvolgere segmenti cromosomici al limite della risoluzione citogenetica (come in alcuni casi di t(15;17), inv(16), o t(8;21)), o regioni con colorazioni al bandeggio simili come nel caso della t(12;21)(p13;q22) [12]. Può inoltre essere un valido approccio, utilizzando un pannello di sonde, nei casi in cui la CC non sia risultata valutabile [13]. Tuttavia, circa un 40-50% di pazienti adulti con LAM non ha alterazioni cromosomiche visibili né in CC né in FISH. In realtà questo gruppo è estremamente eterogeneo a livello molecolare, in termini di mutazioni e variazioni nell'espressione di alcuni geni (Tab.4) [14]. Alcune di queste alterazioni genetiche sono state inserite nella recente classificazione WHO come entità provvisorie [6].

Gene	Posizione	Meccanismo genetico	Incidenza
<b>FLT3</b>	13q12	Internal tandem duplication (ITD)	28-33% *
		Point mutation of tyrosine kinase domain (TKD)	5-14% *
<b>MLL</b>	11q23	Partial tandem duplication (PTD)	5-11% *
<b>CEBPA</b>	19q13.1	Point mutation	10-15% *
<b>NPM1</b>	5q35	Point mutation	45-64% *
<b>WT1</b>	11p13	Point mutation	10% *
<b>NRAS</b>	1p13.2	Point mutation	6-47% **
<b>KRAS</b>	12p12.1	Point mutation	2-23% **
<b>KIT</b>	4q11-4q12	Point mutation	12-47% **

**Tabella 4. Mutazioni genetiche comuni nelle LAM.**\* nelle LAM-NK; \*\* nelle CBF- leukemias (t(8;21) e inv(16)).

### 1.2.4 Prognosi

La prognosi delle LAM dipende da numerosi fattori, e la loro valutazione al momento della diagnosi è fondamentale per la definizione del rischio. In particolare esistono:

- **Fattori prognostici clinici:** età del paziente, tipo di risposta al ciclo di chemioterapia di induzione, LAM primitiva o secondaria, numero di globuli bianchi alla diagnosi, assenza/presenza di localizzazione extramidollare.
- **Fattori prognostici biologici;** cariotipo, immunofenotipo, assenza/presenza di riarrangiamenti o mutazioni che codificano per fattori di trascrizione (RUNX1, CEBPA) e recettori di tirosin-kinasi (FLT3, KIT), per proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina (TET2, ASXL1), e nel metabolismo (IDH1 e IDH2), assenza/presenza di mutazioni del gene N-RAS e NPM1.

Nell'ambito dei fattori clinici, l'età del paziente superiore a 65 anni, il non ottenimento di una risposta completa dopo l'induzione e la presenza di una LAM secondaria sono sicuramente i più importanti fattori prognostici sfavorevoli. Nell'ambito dei fattori biologici i più rilevanti sono le alterazioni genetiche [1].

#### 1.2.4.1 Citogenetica e prognosi

Alterazioni citogenetiche specifiche hanno una forte correlazione con la risposta al trattamento. Molti studi hanno confermato come il cariotipo alla diagnosi rappresenta il più rilevante ed indipendente fattore prognostico nelle LAM in termini di ottenimento della risposta completa alla terapia di induzione e sopravvivenza [10,15]. In base al cariotipo, pazienti con LAM vengono suddivisi in tre ampi gruppi di rischio: “favorevole”, intermedio o sfavorevole [15] (Tab.5).

Rischio	Citogenetica	Alterazioni molecolari
Favorevole	t(8;21)(q22;q22); inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22); t(15;17)(q22;q21)	Citogenetica normale con mutazioni di NPM1 o CEBPA in assenza di FLT3-ITD
Intermedio	Cariotipo normale; +8; t(3;5); t(9;11); altre non definite	Mutazioni di c-Kit con: t(8;21)(q22;q22); inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22);
Sfavorevole	Cariotipo complesso; MK+; -5/5q-; -7/7q-; t(11q23)-non t(9;11); inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26); t(6;9)(p23;q34); 17p-; t(9;22)(q34;q11)	Elevata espressione di EVI1 (con o senza riarrangiamenti 3q26); citogenetica normale con FLT3-ITD in assenza di mutazioni di NPM1

**Tabella 5. Sottogruppi prognostici di LAM basati su alterazioni citogenetiche e molecolari.** MK+: cariotipo monosomiale (adattato da [15])

Il gruppo con prognosi intermedia rappresenta un gruppo molto eterogeneo di pazienti che possono presentare differenti alterazioni citogenetiche, con un impatto prognostico verosimilmente diverso. Moltissime alterazioni genetiche molecolari come mutazioni geniche o alterazioni dell'espressione genica, sono state identificate negli anni passati, svelando l'enorme eterogeneità tra tali sottogruppi. Questo non solo ha permesso una migliore stratificazione dei pazienti, ma anche una migliore comprensione dei meccanismi biologici della patologia e lo sviluppo di nuovi target terapeutici. Questo è stato particolarmente rilevante per i pazienti che presentano un cariotipo normale (45%), dove numerosi ed importanti fattori prognostici sono stati identificati, come mutazioni dei geni FLT3, NPM1, e CEBPA [14]. Recentemente la disponibilità di grandi database e lunghi follow-up ha permesso anche una più dettagliata classificazione citogenetica con l'identificazione di rare alterazioni con differente impatto prognostico e la discriminazione, anche all'interno di presunti gruppi omogenei come le LAM con t(11q23), di traslocazioni come la t(9;11)(p22;q23) con prognosi migliore rispetto ad altri riarrangiamenti di MLL. Nel gruppo a prognosi sfavorevole, anch'esso caratterizzato da un'ampia eterogeneità citogenetica e molecolare, sono state identificate nuove entità: il cariotipo monosomiale (MK+), definito come la presenza di due monosomie autosomali, o di una monosomia in congiunzione con almeno un'alterazione strutturale [16]; e un gruppo caratterizzato da alti livelli di espressione del gene EVI1, che sebbene non comune, è associato con una forma aggressiva di LAM con una prognosi molto sfavorevole [17].

Il gruppo a prognosi sfavorevole rappresenta patologie molte diverse dal punto di vista biologico, di alcune come la t(6;9) o l'inv(3)/t(3;3) sono noti i geni

alterati, di altre come le forme con cariotipi monosomiali o complessi è nota l'elevata frequenza di delezioni o mutazioni del gene TP53, spesso in associazione con delezioni dei cromosomi 5 e 7, ma in entrambi mancano spiegazioni esaustive sui meccanismi patogenetici [18,19].

Oggi marker clinici e genetici giocano un ruolo centrale nella valutazione dei pazienti con LAM, e sono critici nel guidare la gestione clinica, includendo la selezione per i trial clinici (es. FLT3 inibitori) o il consolidamento della remissione con trapianto allogenico [15]. Le LAM con cariotipo sfavorevole richiedono un'attenzione particolare: questa categoria rappresenta una sfida dal punto di vista clinico e la più appropriata scelta terapeutica può variare dalla più aggressiva alle cure palliative [18].

### ***1.3 Sindromi mielodisplastiche (SMD)***

Le sindromi mielodisplastiche sono disordini clonali della cellula staminale emopoietica caratterizzati da ineffettiva ematopoiesi ed un aumento di apoptosi risultante in una citopenia periferica. Le SMD colpiscono per lo più soggetti adulti, con un'età media d'insorgenza di 65-70 anni, con una prognosi variabile e un range di sopravvivenza da poche settimane o pochi mesi fino a più di 10 anni dalla diagnosi. Le SMD possono essere primitive o secondarie a trattamenti radio e/o chemioterapici per altre patologie (SMD terapia correlate, t-SMD); in quest'ultimo caso la prognosi è peggiore rispetto a quella delle SMD primitive [1].

### 1.3.1 Classificazione

La prima classificazione delle SMD fu quella proposta nel 1982 dal gruppo FAB, le cui caratteristiche erano: la presenza di una percentuale di blasti midollari fino al 30% (anemia refrattaria con eccesso di blasti) e la presenza della leucemia mielomonocitica cronica (LMMoC) [20]. Nel 1999 fu introdotta la classificazione WHO [5], che limitava la presenza dei blasti al 20%, cancellava la LMMoC, e introduceva la SMD associata alla delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (5q-). La più recente classificazione WHO (2008) separa le citopenie periferiche in entità distinte (Tab.6) [6].

Refractory cytopenia with unilineage dysplasia
Refractory anemia
Refractory neutropenia
Refractory
thrombocytopenia
Refractory anemia with ring sideroblasts
Refractory cytopenia with multilineage
dysplasia
Refractory anemia with excess
blasts
Myelodysplastic syndrome with
isolated del(5q)
Myelodysplastic syndrome,
unclassifiable
Childhood myelodysplastic
syndrome
<i>Provisional entity: refractory cytopenia of childhood</i>

**Tabella 6. Classificazione WHO delle SMD**



### 1.3.2 Citogenetica

Le SMD sono caratterizzate da un'elevata eterogeneità genetica che si riflette in una profonda eterogeneità clinica e morfologica. In generale, le SMD mostrano un profilo citogenetico caratterizzato dalla presenza di alterazioni sbilanciate. Molto frequentemente si osserva la perdita di materiale genetico in forma di monosomie o delezioni, facendo presupporre che un meccanismo primario nella patogenesi delle SMD sia la perdita o l'inattivazione di geni oncosoppressori, mentre l'attivazione di oncogeni sembra essere meno rilevante. Diversamente dalle LAM, alterazioni strutturali bilanciate come traslocazioni o inversioni sono rare nelle SMD. Circa il 50% dei pazienti con SMD "*de novo*" fino all'80% con t-SMD, mostrano anomalie cromosomiche clonali, le più frequenti sono: -5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e -Y [21].

Sebbene non ci siano delle alterazioni specifiche per le SMD alcune alterazioni correlano strettamente con la morfologia e la clinica, come ad esempio nel caso della delezione del braccio q del cromosoma 5 (5q-). La presenza di quest'alterazione isolata, definisce un sottotipo di SMD definita "sindrome del 5q-" caratterizzata da una buona prognosi e bassa probabilità di trasformazione in LAM [22]. Inoltre, alcune specifiche alterazioni possono permettere di fare diagnosi di SMD in casi in cui le caratteristiche morfologiche siano inconclusive [6].

Nelle SMD, la FISH interfaseica (I-FISH) è diventata un importante strumento diagnostico sia per la precisa definizione delle alterazioni cromosomiche alla diagnosi sia per il monitoraggio post trattamento. Non è sempre possibile ottenere un numero sufficiente di metafasi di buona qualità nelle SMD a causa dell'ipocellularità o del basso tasso di proliferazione delle cellule del midollo.

Inoltre, non tutte le alterazioni sono identificabili in CC. La FISH è particolarmente utile in pazienti con cariotipo normale per identificare alterazioni prognosticamente rilevanti, ed è un utile strumento, affiancata alla CC, nel follow-up dei pazienti [23].

### **1.3.3 Prognosi**

La citogenetica rappresenta un potente fattore prognostico ed insieme alla percentuale di blasti nel midollo e al grado di citopenia periferica è utilizzata nelle classificazioni maggiormente utilizzate per determinare la prognosi. Un esempio di tale tipo di classificazione è rappresentato dall'International Prognostic Scoring System (IPSS) che stratifica i pazienti in basso rischio (low e intermediate-1) e alto rischio (intermediate-2 e high) [24].

In questa classificazione un cariotipo normale, la perdita del cromosoma Y, la delezione 5q, la delezione 20q isolate sono associate ad una buona prognosi; un cariotipo complesso e qualsiasi alterazione del cromosoma 7 sono associate ad una prognosi sfavorevole; tutte le altre con una prognosi intermedia. Negli ultimi anni si è fortemente cercato di sviluppare nuovi sistemi prognostici per le SMD quali il WPSS cioè un sistema prognostico basato sulla classificazione WHO che comprende le caratteristiche morfologiche secondo WHO, la citogenetica secondo IPSS e il fabbisogno trasfusionale [25]. Recentemente inoltre è stato possibile attribuire un significato prognostico anche ad alterazioni più rare o alla presenza di due o più alterazioni concomitanti e definire più classi di rischio citogenetico che meglio definiscono la prognosi rispetto a quelle dell'IPSS (Tab.7) [26,27].

Gruppo prognostico	Alterazione citogenetica		
	Isolata	2 alterazioni	Complesso
Molto basso	del(11q) ,-Y		
Basso	Normale, del(5q), del(12p), del(20q)	se presente del(5q)	
Intermedio	del(7q), +8, i(17q), +19, tutte le altre	tutte le altre	
Alto	inv(3)/t(3q)/del(3q), -7	se presente -7/del(7q)	3 alterazioni
Molto alto			( $\geq 3$ alterazioni)

**Tabella 7. Sottogruppi prognostici di SMD basati su alterazioni citogenetiche.**  
Adattato da [27]

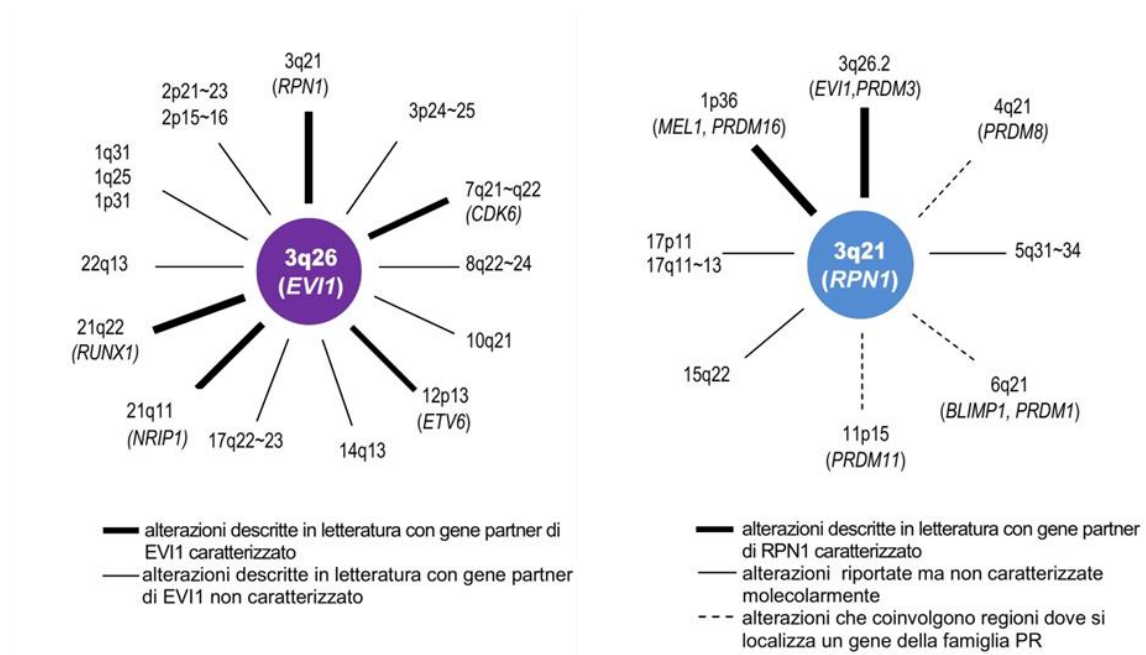
Molto recentemente il risultato dell'analisi citogenetica è diventato la base per la selezione di nuovi trattamenti mirati con nuovi agenti terapeutici, come la lenalidomide nel caso della sindrome 5q- [28].

#### ***1.4 Alterazioni delle regioni cromosomiche 3q21 e 3q26***

Alterazioni del braccio cromosomico 3q sono state descritte in circa il 2-5% dei pazienti affetti da LAMe 1-2% nei pazienti con SMD, con breakpoints localizzati principalmente nelle regioni 3q21 e 3q26 [9,21,29,30]. Il gene EVI1 (ecotropic viral-integration on site 1) è il principale target delle alterazioni che coinvolgono la regione 3q26 nelle sindromi mieloproliferative [31-33].

Le alterazioni citogenetiche più frequenti e meglio caratterizzate che coinvolgono EVI1 sono: l'inv(3)(q21q26) e la t(3;3)(q21;q26) in cui gene partner è RPN1 (ribophorin 1) [31-34]; t(3;21)(q26;q22) con gene partner RUNX1 (runt-related transcription factor1)[35,36] e t(3;12)(q21;p13) con gene partner ETV6 (ets variant 6) [37]. Sono state descritte altre traslocazione rare ma ricorrenti, che coinvolgono la regione 3q26 ed EVI1, ma non in tutte è stato identificato il gene partner [30,38-43] (Fig.1). Oltre ai riarrangiamenti 3q26, sono state riportate numerose traslocazioni bilanciate e sbilanciate della regione cromosomica 3q21 [30,34,38]. La più riportata in letteratura è la t(1;3)(p36;q21) che coinvolge il gene RPN1 e PRDM16 (PR domain containing 16), omologo di EVI1, localizzato nella regione cromosomica 1p36 [44].

Sono state descritte altre traslocazioni che coinvolgono la regione 3q21, e probabilmente RPN1, con altre regioni cromosomiche [30]; in alcune di queste regioni si localizzano altri membri della famiglia genica "PR domain protein" (PRDM) di cui fanno parte EVI1 e PRDM16, suggerendo come altri geni di questa famiglia possano giocare un ruolo importante nella trasformazione leucemica, specialmente se posti sotto il controllo trascrizionale degli elementi regolatori del gene RPN1 (Fig.1).



**Figura 1. Traslocazioni ricorrenti che coinvolgono le regioni cromosomiche 3q26 e 3q21**

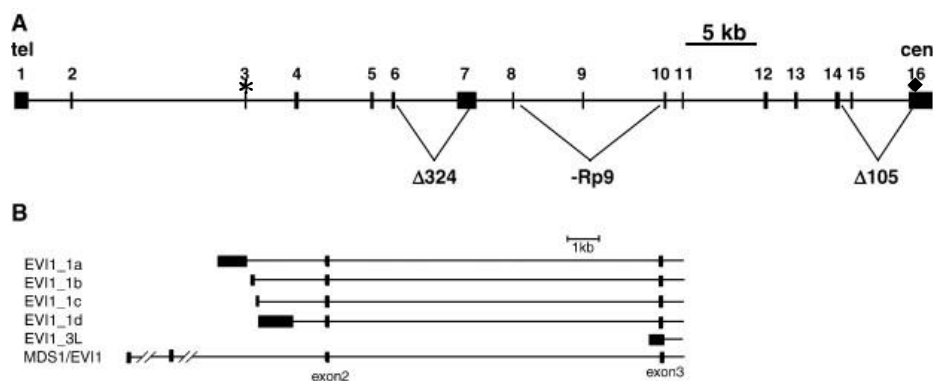
In alcuni studi, qualsiasi alterazione coinvolgente il braccio 3q sembra essere associata ad una prognosi sfavorevole nelle LAM, nelle SMD tali alterazioni sono inserite nel gruppo a prognosi intermedio o sfavorevole a seconda delle casistiche [25,26,30,34-39]. Nella recente classificazione WHO del 2008 dei tumori dei tessuti linfoide ed emopoietici solo le LAM con inv(3)/t(3;3) sono state riconosciute come un'entità clinica distinta con un significato prognostico sfavorevole ed inserita nella categoria "AML with recurring genetic abnormalities" [6].

Nell'appropriato contesto clinico, la presenza della t(1;3)(p36;3q21) e t(3;21)(q26;q22) sono inserite tra le alterazioni sufficienti per fare diagnosi di "AML with myelodysplasia related changes". Le stesse due traslocazioni e l'inv(3) sono invece sufficienti per fare diagnosi di SMD, in entrambi i casi mantengono però un significato clinico non chiaro [6].

### 1.4.1 Struttura del gene EVI1 e relativa proteina codificata

Il gene EVI1 è stato identificato per la prima volta come un comune locus d'integrazione retrovirale in neoplasie mieloidi di alcuni ceppi murini [45]. Nell'uomo EVI1 recentemente definito MECOM (MDS1 and EVI1 complex locus), si estende nella regione cromosomica 3q26.2 per circa 60 Kb e contiene 16 esoni [46,47].

Dal gene EVI1 vengono generati diversi RNA messaggeri (mRNA) sia attraverso splicing alternativi sia per la presenza di diverse varianti al 5' (Fig.2) [46].



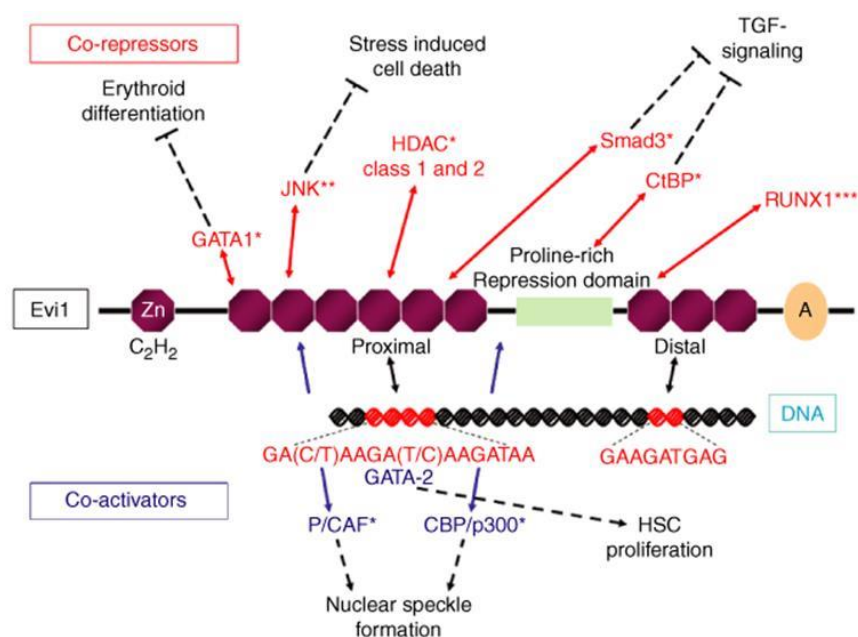
**Figura 2. Struttura genomica e trascritti varianti del locus EVI1.** (A) Struttura del gene EVI1. Gli esoni sono indicati da rettangoli e numerati. L'asterisco indica l'inizio della traduzione; il rombo, la fine della traduzione. Tre mRNA varianti generati da splicing alternativi sono indicate da linee triangolari. (B) Trascritti alternativi varianti al 5' del gene EVI1.

La principale forma prodotta codifica per una proteina composta da 1051 amminoacidi contenente un dominio N-terminale composto da 7 motivi zinc-finger, un dominio centrale di repressione della trascrizione 'proline-rich', un

secondo dominio con 3 motivi zinc-finger e una regione acida al C-terminale (Fig.3).

Numerosi studi hanno evidenziato come EVI1 sia in grado di agire come fattore trascrizionale regolando l'espressione di diversi geni target riconoscendo, attraverso i motivi zinc-finger, specifiche sequenze consenso nel DNA [48]. Tra i geni regolati da EVI1, ci sono: GATA1, GATA2, PBX1 e PML [49-51]. Inoltre, è in grado di interagire con co-repressori e co-attivatori trascrizionali, quali smad3 e CtBP, ed agire come regolatore negativo della via di segnalazione del TGF- $\beta$  [52]. In più, esercita un effetto anti-apoptotico interagendo con JNK1 e sopprimendo la fosforilazione di c-Jun mediata da JNK1 [53] o inibendo la via dell'interferon- $\alpha$  regolando PML [51].

Infine, recentemente è stato ipotizzato che EVI1 sia in grado di regolare i suoi geni target attraverso il reclutamento di modificatori epigenetici tra cui HDACs (istoni de-acetilasi) e DNMTs (DNA metil-trasferasi), fungendo da collegamento tra i regolatori epigenetici e vie di segnalazione intracellulari (Fig.3). È stato ipotizzato che proprio attraverso questo meccanismo EVI1 sia in grado di reprimere PTEN e di conseguenza il pathway PI3K/PTEN/AKT/mTOR [54].

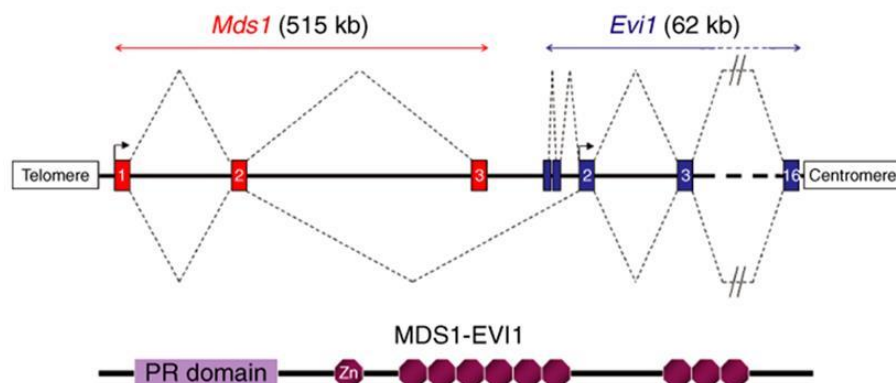


**Figura 3. Mappa delle interazioni di EVI1.** EVI1 è composto da 10 domini 'zinc fingers'(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) divisi in un dominio prossimale (N-terminale) ed in un dominio distale (C-terminale). Tra il dominio prossimale e distale è presente una regione 'proline rich', al C-terminale si trova una regione acida. Il fattore di trascrizione EVI1 è in grado di interagire con diversi cofattori. Per esempio, interagisce con dei co-repressori come GATA1, JNK, HDAC I and II, Smad3, CtBP, e RUNX1, e inibisce differenti pathways come il differenziamento eritroide, morte cellulare indotta da stress, o la via di trasduzione del segnale del transforming growth factor-beta (TGF-β). EVI1 interagisce anche con il promotore di GATA-2 e ne attiva la trascrizione, collegando EVI1 alla proliferazione della cellula staminale emopoietica (HSC). CPB/p300, cAMP- responsive element-binding protein-binding protein; GATA1 and -2, GATA- binding protein-1 and -2; HDAC, histone deacetylase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; P/CAF, p300/CBP-associated factor; RUNX1, runt-related transcription factor 1

Esiste anche un'isoforma più lunga di EVI1, definita MDS1/EVI1, che contiene 188 amminoacidi addizionali all'N terminale che codificano per un dominio chiamato "PR- domain". Questa estensione è generata da uno splicing intergenico tra il secondo esone del gene MDS1 (myelodysplasia syndrome 1) e il secondo esone di EVI1 (Fig.4) [46,47,55].



Il dominio PR, codificato da MDS1, è altamente conservato ed identifica una famiglia di proteine (PRDM) (tra cui: BLIMP1, PRDM16(MEL1), RIZ1, PMF1) tutte caratterizzate dalla presenza del dominio PR e motivi zinc-finger. Il dominio PR è simile al dominio SET, una sequenza altamente conservata di circa 130 amminoacidi con attività di istone metil-transferasi [56]. Tutti i membri di questa famiglia esistono in due forme: una con il dominio PR (PR+) e una forma più corta senza dominio PR (PR-) generata da un promotore interno. Nel locus di EVI1 i due promotori sono separati da centinaia di kb, sono regolati indipendentemente e controllano l'espressione di proteine separate [47,55,57].



**Figura 4. Struttura genica e proteica di MDS1-EVI1.** Il gene MDS1 è composto da tre esoni e si estende per 515 kb, mentre il gene EVI1 copre 62 kb ma ha 16 esoni. MDS1-EVI1 è prodotto attraverso lo splicing alternativo tra MDS1 ed EVI1. A livello proteico lo splicing tra MDS1 ed EVI1 genera una proteina con un nuovo dominio N-terminale chiamato 'PR domain'.

#### 1.4.2 Riarrangiamenti di EVI1

Alla diagnosi riarrangiamenti del gene EVI1 sono stati descritti principalmente in LAM e SMD, più raramente in sindromi mieloproliferative croniche, e sono

frequentemente associati ad alterazioni del cromosoma 7 (nella maggioranza dei casi la monosomia 7), possono essere presenti anche in fase di ricaduta o evoluzione della malattia, come in alcuni casi di leucemia mieloide cronica, suggerendo un ruolo nella progressione della malattia alla fase acuta [32-41,58].

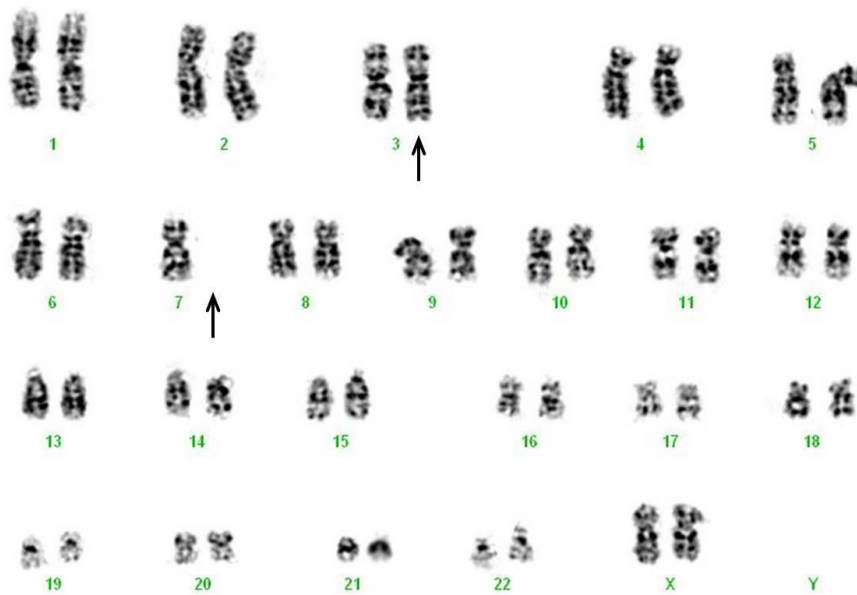
I breakpoints nelle traslocazioni che coinvolgono EVI si distribuiscono lungo una regione che si estende per circa 900 kb e possono interessare le regioni 5', quelle 3' oppure all'interno del gene. Nelle inversioni i breakpoints tendono ad essere localizzati centromericamente (al 3' EVI1), mentre nelle traslocazioni si localizzano preferenzialmente in posizione telomerica (al 5' EVI1). Esiste però un'elevatissima eterogeneità nei breakpoints anche all'interno di uno stesso tipo di alterazione citogenetica [59-61].

In base alla posizione del breakpoint è possibile: (1) la formazione di un gene di fusione che coinvolge EVI1, (2) la formazione di un gene di fusione che coinvolge MDS1/EVI1, (3) scambio di sequenze regolatorie con un gene partner ubiquitariamente espresso.

#### **1.4.2.1 inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)**

La traslocazione più frequente che coinvolge EVI1 è l'inv(3)(q21q26) (Fig.5), meno frequente è la t(3;3), molto rara è invece l'ins(3); queste alterazioni rappresentano varianti una dell'altra, condividono le stesse caratteristiche e possono essere, pertanto, raggruppate in un'unica entità. Esse rappresentano l'1-2% di tutte LAM e possono essere associate a tutti i tipi FAB, con eccezione del citotipo M3 [30,31]. Sono state anche osservate in sindromi mielodisplastiche (~1%) e mieloproliferative, oltre che in crisi blastica di leucemia mieloide cronica

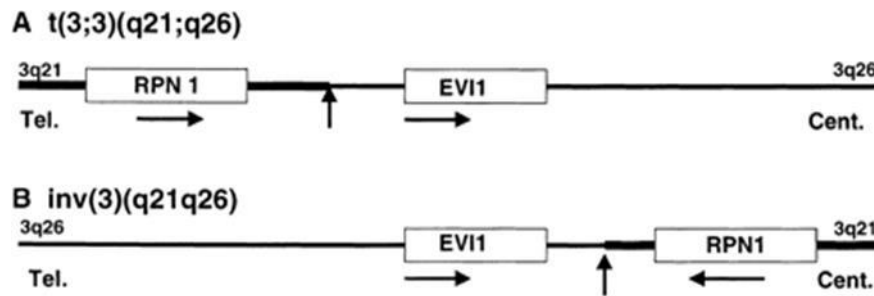
[58,60,62,63]. Dal punto di vista clinico pazienti con inv(3)/t(3;3) sono in genere più giovani e condividono alcune caratteristiche morfologiche e cliniche, quali normale o elevato numero di piastrine, displasia multilineare nel midollo con megacariociti atipici, una scarsa risposta alla terapia e una prognosi sfavorevole [31,62,63].



**Figura 5. Cariotipo: 45,XX,inv(3)(q21q26),-7**

Le alterazioni addizionali più frequenti coinvolgono il cromosoma 7, come monosomia o delezione del braccio q (-7/7q-) riscontrate in più del 50% dei casi. Pazienti con SMD e inv(3)/t(3;3) condividono le stesse caratteristiche cliniche e genetiche dei pazienti con LAM e presentano un alto rischio di progressione [58]. Le conseguenze molecolari dell'inv(3)/t(3;3) sono la giustapposizione del gene

RPN1, localizzato nella banda cromosomica 3q21, ad EVI1. Nell'inv(3) i breakpoints sono principalmente al 3' o all'interno del gene mentre nella traslocazione si osserva principalmente una distribuzione al 5' (Fig.6) [32,59,60].



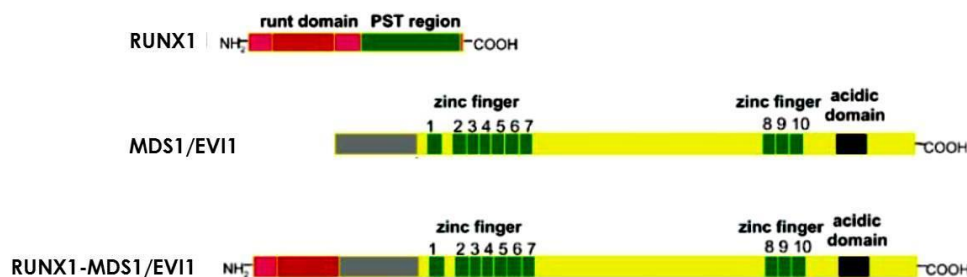
**Figura 6. Schema di attivazione genica nella (A) t(3;3)(q21;q26) e (B) inv(3)(q21q26).** La posizione e l'orientamento di RPN1 ed EVI1 sono indicati dalle frecce orizzontali. Tel =telomero; Cent=centromero. Le frecce verticali indicano la posizione principale dei breakpoints.

Per quanto riguarda i breakpoints a livello della regione 3q21, questi sono distribuiti in una regione di circa 235 kb al 3' di RPN1 [59]. Diversamente dalla regione 3q26, esistono due breakpoint cluster region (BCR), una di circa 30 kb localizzata a 15kb da RPN1 e una a 60 kb dalla prima [59,64].

Il gene RPN1 codifica per una glicoproteina di membrana altamente conservata, presente nel reticolo endoplasmatico rugoso, ed è ubiquitariamente espresso ad alti livelli. Dato l'orientamento trascrizionale, è stato ipotizzato che il promotore/enhancer del gene house-keeping RPN1 determini un'espressione aberrante del gene EVI1 (Fig.6) [57,61]; in alcuni casi è stata descritta la formazione di un gene di fusione RPN1-EVI1 associata comunque ad un'overespressione genica [31].

#### 1.4.2.2 t(3;21)(q26;q22)

La traslocazione t(3;21)(q26;q22) è stata osservata sia in LAM secondarie a SMD, sia in crisi blastica di leucemia mieloide cronica. Poiché molto raramente si osserva in leucemie acute “*de novo*”, è stato ipotizzato che la comparsa di tale alterazione induca la trasformazione di un disordine emopoietico cronico in una fase acuta [35,65,66]. La t(3;21)(q26;q22) determina la formazione di un gene di fusione tra RUNX1(AML1) normalmente localizzato nella regione 21q22 ed EVI1 [35]. I breakpoints cromosomici nella t(3;21) avvengono all’interno del gene RUNX1; mentre a livello di EVI1, similamente all’inv(3)/t(3;3), la posizione dei breakpoints è più variabile, più frequentemente al 5’, ma anche all’interno di EVI1. Il risultato, quindi, a livello molecolare è la formazione di multipli trascritti di fusione tra cui frequentemente RUNX1-MDS1/EVI1, che codifica per una proteina in cui la porzione N terminale di RUNX1, fino al dominio RHD (Runt homology domain), è fusa all’intera regione codificante di EVI1 (Fig.7) [36,57].



**Figura 7. Struttura dei geni RUNX1 wild-type, MDS1-EVI1 e RUNX1-MDS1/EVI1.** RUNX1 wild-type possiede il dominio RHD (runt homology domain) all’N terminale e il dominio PST (proline-serine-threonine), necessario per l’attivazione trascrizionale, al C-terminale. In RUNX1-MDS1/EVI1, le sequenze N-terminali di RUNX1 vengono interrotte alla fine del dominio RHD e seguite dalle sequenze di MDS1/EVI1.

Il gene RUNX1 fu identificato inizialmente in LAM con t(8;21)(q22;q22) [67], da allora è stato trovato coinvolto in diverse traslocazioni sia in LAM che in LAL [68]. RUNX 1 è un fattore di trascrizione indispensabile per l'espressione di diversi geni emopoietici lineage specifici tra cui: MPO, CSF, GM-CSF, IL3 e TCR, legando specifiche sequenze consenso tramite il dominio RHD, è, quindi, un fattore di trascrizione fondamentale per lo sviluppo, la proliferazione ed il differenziamento del sistema emopoietico [69]. Nelle cellule leucemiche di pazienti con t(3;21) è stata dimostrata l'espressione del trascritto chimerico, ma l'effetto leucemogenico sembra essere mediato dall'overespressione di EVI1 piuttosto che dal gene di fusione in se [70,71]. Non è possibile però escludere un effetto del trascritto chimerico che, come altri geni di fusione, che coinvolgono RUNX1 esercita un effetto dominante negativo sulla trascrizione indotta da RUNX1 wild-type, può inoltre reclutare attraverso EVI1 corepressori e reprime la trascrizione dei geni target di RUNX1 [71].

#### **1.4.2.3 t(3;12)(q26;q21)**

La traslocazione t(3;12) determina la formazione di un gene di fusione di ETV6 (12p13) con EVI1. I breakpoints risiedono prevalentemente all'interno del gene ETV6 tra gli esoni 2 e 3, mentre a livello di EVI1 sono, prevalentemente, telomerici [37,72]. Il risultato è la formazione di un trascritto chimerico ETV6-MDS1/EVI1, in cui una piccola porzione N-terminale di ETV6 è fusa all'intera sequenza di EVI1 [37]. ETV6 è un membro della famiglia di fattori trascrizionali ETS, ed è un gene target di alterazioni cromosomiche che coinvolgono la regione 12p13 in patologie ematologiche mieloidi e linfoidi [73]. Il potenziale

oncogenetico della traslocazione è dovuto unicamente all'espressione aberrante di EVI1 guidata dal promotore di ETV6, che è normalmente espresso nelle cellule emopoietiche, infatti, diversamente da RUNX1 nessun dominio funzionale di ETV6 viene mantenuto nel prodotto chimerico. Similmente alla t(3;21), la t(3;12) sembra essere associata a crisi blastica di LMC, LAM secondarie a SMD; sono spesso presenti alterazioni addizionali e come per altri riarrangiamenti di EVI1 è associata ad una prognosi sfavorevole [37].

### **1.4.3 Espressione di EVI1 e leucemogenesi**

Studi su modelli murini hanno dimostrato che EVI1 è indispensabile per il mantenimento dell'emopoiesi. EVI1 è espresso ad alti livelli nel compartimento staminale, dove identifica un gruppo di cellule staminali (SC) e progenitori molto precoci, mentre viene down-regolato durante il differenziamento ed è espresso solo a bassi livelli nel midollo normale [74-76]. Un ruolo di EVI1 nella normale emopoiesi è di regolare la transizione tra cellule staminali e progenitori più commissionati, agendo sul bilanciamento tra differenziamento e self-renewal, inibendo il primo e favorendo il secondo [46,74]. È stato ipotizzato che MDS1-EVI1 ed EVI1 regolino l'emopoiesi in momenti diversi e con diversi meccanismi. In particolare, MDS1-EVI1 sarebbe coinvolto nel mantenimento della quiescenza delle SC attraverso la regolazione del ciclo cellulare [76].

Oltre ad un ruolo fondamentale nell'emopoiesi normale, la deregolazione dell'espressione di EVI1 è stata osservata in sindromi mieloidi in presenza di traslocazioni cromosomiche della regione 3q26. In questi pazienti la trascrizione di EVI1 è posta sotto il controllo di sequenze regolatorie di geni

espressi ubiquitariamente o in specifici lineage che ne determina l'espressione aberrante [33,57]. Il potenziale leucemogenico di EVI1 è stato dimostrato in modelli murini, nei quali l'overespressione di EVI1 induce una sindrome mieloproliferativa letale, tipo mielodiplasia, ma non è sufficiente a indurre una leucemia acuta [77,78].

È stato ipotizzato quindi che sia necessaria una seconda alterazione che cooperi con EVI1, in accordo con il modello "two-hits" della trasformazione leucemica [79]. Nell'uomo la conferma che sia necessaria una seconda alterazione è data dall'osservazione della frequente presenza di alterazioni addizionali particolarmente della monosomia del cromosoma 7. Il legame tra espressione aberrante di EVI1 e monosomia 7 rimane ancora da elucidare. Un recente studio ha fatto in parte luce su tale relazione, dimostrando come l'integrazione di un vettore retrovirale in diversi siti, tra cui MDS1-EVI1, ne abbia determinato l'attivazione, inducendo un'espansione clonale con successiva acquisizione della monosomia 7 e trasformazione leucemica, in due pazienti affetti da granulomatosi cronica X-linked trattati con terapia genica. Nello stesso studio, è stata dimostrata un incremento d'instabilità genomica nelle cellule dei pazienti esprimenti MDS1-EVI1 e un aumento nella frequenza di alterazioni centrosomiche in fibroblasti umani che esprimevano EVI1 [80].

Sebbene l'elevata espressione di EVI1 sia un marker di sindromi mieloproliferative con alterazioni cromosomiche della regione 3q26, alti livelli di EVI1 sono stati riportati in circa il 10% di LAM in assenza di riarrangiamenti cromosomici 3q26 [17]. In particolare l'overespressione di EVI1 è associata a specifici gruppi con differenti caratteristiche citogenetiche, quali: cariotipo normale, monosomia 7 e



riarrangiamenti di MLL (11q23), dove identifica un gruppo di pazienti a prognosi particolarmente sfavorevole [81], mentre è assente nei gruppi a prognosi favorevole [82]. L'aberrante espressione di EVI1 sembra essere un fattore indipendente di prognosi sfavorevole, in termini di risposta alla terapia e sopravvivenza in pazienti con LAM [17].

#### ***1.4.3.1 Espressione differenziale di MDS1-EVI1 e EVI1***

MDS1-EVI1 ed EVI1 sono i due trascritti principali del locus MECOM. In presenza di un riarrangiamento EVI1 è sempre overespresso, mentre MDS1-EVI1 mostra un pattern più variabile ed in alcuni casi può non essere espresso. L'abrogazione dell'espressione di MDS1-EVI1 può essere in alcuni casi il risultato di un breakpoint tra MDS1 ed EVI1. In particolare, le LAM con inv(3)/t(3;3) comunemente esprimono alti livelli di EVI1, mentre l'espressione di MDS1-EVI1 è bassa o assente; al contrario un'elevata espressione di MDS-EVI1 è invece spesso riscontrata in presenza di riarrangiamenti che generano trascritti di fusione quali RUNX1-MDS1-EVI1 o ETV6-MDS1-EVI1 che risultano rispettivamente dalle traslocazioni t(3;21) e t(3;12) [30]. Lo sproporzionato livello dei due trascritti nei pazienti con inv(3)/t(3;3) fa propendere per un ruolo patogenetico di EVI1 (la forma PR+) rispetto ad MDS1/EVI1 (PR-), come accade per altri membri della famiglia PRDM [57].

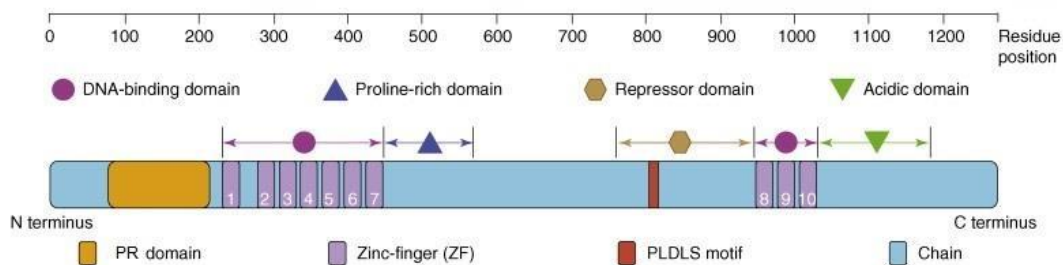
### ***1.5 Alterazioni della regione cromosomica 1p36***

Alterazioni della regione 1p36 sono ricorrenti in patologie ematologiche e presenti in varie forme. Le alterazioni più frequenti, sia in patologie mieloidi che linfoidi, sono riarrangiamenti cromosomici sbilanciati, di solito descritti come add(1)(p36). Sono, comunque, riportate anche traslocazioni bilanciate e delezioni. Riarrangiamenti della regione 1p36 sono frequenti nei linfomi non-Hodgkin (12%), mentre delezioni 1p36 si riscontrano in circa il 20% dei linfomi follicolari. Ci sono pochi dati in letteratura sulla frequenza e tipo di alterazioni della regione 1p36 nelle sindromi mieloproliferative. Un recente studio ha dimostrato come riarrangiamenti 1p36 nelle sindromi mieloproliferative sono più frequentemente bilanciati e/o telomerici rispetto a quelli linfoidi, con breakpoints ampiamente distribuiti. Un nuovo gene bersaglio di riarrangiamenti 1p36 identificato in questo studio è TP73 (tumor protein p73), omologo di TP53, e potenzialmente quindi con attività di tumor-suppressor. La frequenza di queste alterazioni in tumori ematologici e non, può coinvolgere meccanismi oncogenetici comuni che coinvolgono geni tumor suppressor nel caso di delezioni, oncogeni nel caso di traslocazioni bilanciate e una combinazione di entrambi nel caso di riarrangiamenti sbilanciati [83].

Il gene PRDM16 è il principale bersaglio dei riarrangiamenti che coinvolgono il locus 1p36 nelle sindromi mieloproliferative, ma diversamente da EVI1, è coinvolto anche in sindromi linfoproliferative [84].

### 1.5.1. Struttura del gene PRDM16 e relativa proteina codificata

Il gene PRDM16 (noto anche come MEL1) fu identificato per la prima volta come gene coinvolto nella traslocazione t(1;3)(p36;q21) associata a LAM e SMD. Il gene si estende nella regione 1p36.3 per circa 369.4 kb con direzione centromerica e composto da 17 esoni (Fig.8) [44,85].

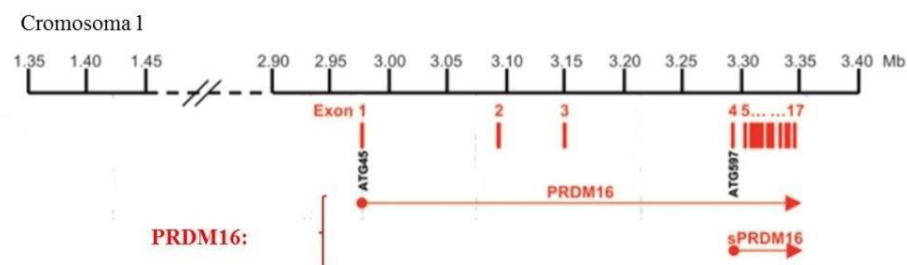


**Figura 8. Struttura proteica di PRDM16.** Dopo il dominio PR all’N-terminale, la proteina ha un dominio zinc-finger, un dominio ‘proline rich’, un dominio di repressione, un secondo dominio zinc-finger e un dominio acido al C-terminale.

La sequenza nucleotidica di PRDM16 è per il 63% omologa a quella di EVI1. La struttura della proteina è simile a quella prodotta dallo splicing tra MDS1 ed EVI1, contenente un dominio N-terminale composto da 7 motivi zinc-finger, un dominio ‘proline-rich’, un dominio centrale di repressione della trascrizione, un secondo dominio zinc-finger con tre motivi e regione acida al C-terminale (Fig.8).

Inoltre, in posizione N-terminale è presente un dominio acido di 132 amminoacidi omologo al dominio PR del gene MDS1, conservato tra diverse proteine, che rende

PRDM16 un membro della famiglia PRDM. Come avviene per EVI1, due mRNA vengono trascritti dal gene PRDM16, uno con inizio della trascrizione dal secondo esone che genera una proteina contenente il dominio PR (PRDM16) e uno con inizio della trascrizione da un codone interno nell'esone 4 che codifica per una isoforma più corta senza PR domain (sPRDM16) (Fig.9) [86,87].



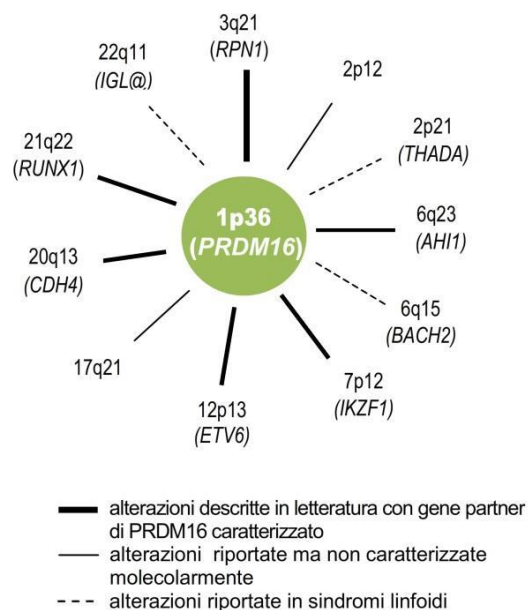
**Figura 9. Posizione e struttura genica di PRDM16.** Gli esoni sono mostrati in rosso, insieme con i codoni ATG d'inizio di PRDM16 e sPRDM16 negli esoni 1 e 4, rispettivamente.

La proteina agisce con fattore di trascrizione con una duplice attività sia di attivatore sia repressore della trascrizione legando direttamente il DNA o interagendo con altre proteine ad esempio con il corepressore CtBP2 e C/EBP- $\beta$  [88-90]. PRDM16 interagisce con diverse proteine Smad (smad2, smad3) e può modulare la via di del TGF- $\beta$  come EVI1 [91].

Una funzione ben nota di PRDM16 è quella nell'adipogenesi del grasso bruno, dove la sua espressione induce il differenziamento di progenitori comuni tra lineage muscolare e adipocitico, verso l'adipogenesi del grasso bruno. In questa sua funzione PRDM16 dipende dalla sua interazione con la proteina PPAR $\gamma$  [92].

### 1.5.2 Riarrangiamenti di PRDM16

La più frequente traslocazione riportata è la t(1;3)(p36;q21), seguita dalla t(1;21)(p36;q22). In letteratura sono descritte altre traslocazioni coinvolgenti PRDM16 spesso, però, riportate in singoli casi (Fig.10) [84].



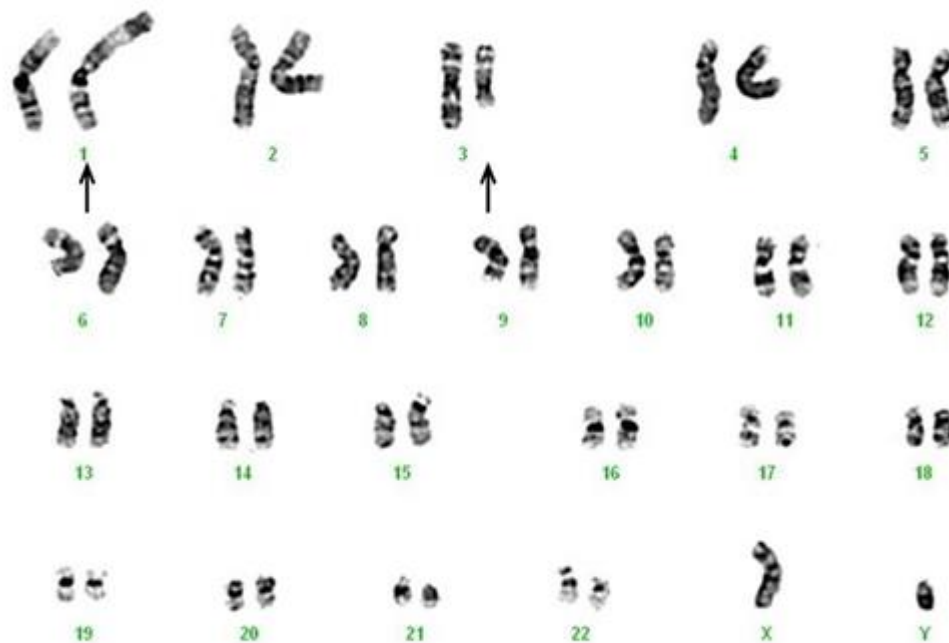
**Figura 10. Traslocazioni ricorrenti e sporadiche che coinvolgono la regione cromosomica 1p36 e PRDM16.**

Riarrangiamenti di PRDM16 occorrono principalmente in patologie mieloidi (principalmente SMD e LAM secondarie a terapia), ma sono stati descritti anche alcuni casi sporadici in patologie linfoidi, suggerendo un possibile ruolo di PRDM16 nella linfomagenesi. I riarrangiamenti di PRDM16 avvengono principalmente alla diagnosi, e sono spesso la sola alterazione; in alcuni casi l'alterazione, non presente alla diagnosi, compare in fase di ricaduta o in

evoluzione della malattia suggerendo un ruolo nella progressione [84,93,94]. I breakpoints sono distribuiti in un'ampia regione al 5' del gene e all'interno del gene stesso, non sono stati riportati casi con breakpoint al 3' del gene [85-87]. Come avviene per EVI1 le traslocazioni che coinvolgono PRDM16 possono essere suddivise in due categorie a seconda del meccanismo molecolare: (1) up-regolazione trascrizionale in seguito a scambio delle sequenze regolatorie con un gene partner ubiquitariamente espresso e (2) formazione di un gene di fusione.

#### 1.5.2.1 t(1;3)(p36;q21)

La deregolazione trascrizionale, dovuto ad uno scambio di promotore, è caratteristico della traslocazione t(1;3)(p36;q21) che coinvolge i geni PRDM16 e RPN1 (Fig.11) [85-86].



**Figura 11. Cariotipo: 46,XY,t(1;3)(p36;q21)**

È la più frequente alterazione che coinvolge PRDM16, descritta soprattutto in casi di LAM e SMD (spesso casi secondari a chemioterapia) e seppur più raramente anche in SMC. Nel 90% dei casi si presenta all'interno di un cariotipo non complesso ( $\leq 3$  alterazioni clonali), spesso come singola alterazione [84]. Dal punto di vista clinico si presenta frequentemente con displasia trilineare, dismegacariocitopoiesi, normale o elevato numero di piastrine scarsa risposta alla terapia e una prognosi sfavorevole [57], caratteristiche simili ad LAM e SMD con inv(3)/t(3;3) e riarrangiamento di EVI1, che come abbiamo già ricordato sono ora considerate come una entità distinta dalla WHO. I breakpoints nella regione 1p36 sono localizzati al 5' del gene (distribuiti in un'ampia regione che si estende fino a 300 kb dall'inizio del gene) o all'interno del gene stesso principalmente tra gli esoni 1 e 2 [95,96].

I breakpoints nella regione 3q21 sono meno eterogenei, con due distinti cluster entrambi localizzati a valle del gene RPN1.

La traslocazione determina la giustapposizione della sequenza di PRDM16 al 3' del gene RPN1 e risulta nell'overespressione di sPRDM16, nella maggioranza dei casi si ha l'espressione anche di PRDM16 [84-87]. Inoltre è stata dimostrata l'overespressione di FLJ42875 un gene fiancheggiante PRDM16 ma in orientamento opposto [86,94].

L'up-regolazione di PRDM16 e sPRDM16 in seguito a traslocazioni con geni partner ubiquitariamente espressi o espressi in specifici lineage, può essere il meccanismo oncogenetico coinvolto in altre traslocazioni meno frequenti o riportate in singoli casi come ad esempio: la t(1;2)(p36;p21) [84,93,94] identificata in tre casi (1 MF, 1 SMDpostLMMoC, 1 LAL-T) il cui gene partner

coinvolto è THADA (coinvolto negli adenomi tiroidei) [97] oppure la  $t(1;22)(p36;q11)$  con il possibile gene partner essere IGL@ coinvolto in un linfoma splenico della zona marginale [84].

#### **1.5.2.2 $t(1;21)(p36;q22)$**

La traslocazione  $t(1;21)(p36;q22)$  è la seconda più frequente traslocazione che coinvolge PRDM16; il risultato molecolare è la formazione di un gene di fusione tra PRDM16 e il fattore di trascrizione RUNX1, noto per essere coinvolto in diverse traslocazioni con diversi geni partner tra cui va ricordato EVI1 nella  $t(3;21)$ . Il breakpoint nella regione 1p36 è localizzato all'interno del gene nel primo introne, mentre il breakpoint in RUNX1 è tra gli esoni 5 e 6. La traslocazione determina la formazione di un gene di fusione RUNX1-PRDM16 composto dagli esoni 1-5 di RUNX1 e 2-17 di PRDM16 localizzato sul cromosoma derivativo 1 [84,93,98-100]. Il trascritto di fusione ha un'elevata omologia di sequenza con RUNX1-MDS1/EVI1. Va rilevato come siano stati riportati dei casi di riarrangiamenti criptici RUNX1- PRDM16 [101-103], indicando come la frequenza di questi riarrangiamenti possa essere sottostimata nelle patologie ematologiche. Anche nella traslocazione  $t(1;12)(p36;p13)$  si genera un trascritto di fusione tra il gene ETV6, fattore di trascrizione coinvolto come RUNX1 in molte traslocazioni con diversi geni partner in sindromi mieloidi e linfoidi, e PRDM16. Il breakpoint in PRDM16 è simile a quello osservato nella  $t(1;21)$  mentre in ETV6 è lo stesso della  $t(5;12)$  con il gene partner PDGFR $\beta$ . Il trascritto chimerico contiene gli esoni 1-4 di ETV6 fusi agli esoni 2-17 di PRDM16, che permette la formazione di una proteina di fusione che mantiene il



protein-interaction domain di ETV6 e la maggior parte della proteina PRDM16 [84]. Un altro fattore di trascrizione coinvolto in una traslocazione con PRDM16 è BACH2 descritto in una t(1;6)(p36;q15), in cui la regione al 5' di BACH2 (esoni 1-5) è fusa agli esoni 4-17 di PRDM16 [93]. In questo caso è stata osservata solo l'espressione di sPRDM16 e non di PRDM16, in accordo con un diverso breakpoint che forse permette l'espressione della sola sPRDM16. In tutti i casi, il riarrangiamento determina un'overespressione di PRDM16, probabilmente guidata dalle sequenze regolatorie dei vari geni partner. Non si può però escludere il contributo dei geni partner nella patogenesi, infatti, vengono mantenuti nel caso di RUNX1 il dominio RUNT di legame al DNA, o il dominio di legame proteina-proteina di ETV6.

### **1.5.3 Espressione di PRDM16 e leucemogenesi**

PRDM16 viene espresso selettivamente nelle SC e nei progenitori più precoci, e svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento del pool di cellule SC durante lo sviluppo e dopo trapianto, regolando direttamente o indirettamente un elevato numero di fattori di trascrizione critici per le funzioni delle SC. PRDM16 si pone come un nodo importante in un network che regola il self-renewal, il differenziamento e l'apoptosi, in parte agendo attraverso la regolazione di TP53, PBX1, GATA2, BMI1 ed EVI1 stesso [104]. L'espressione di PRDM16 è spenta durante il differenziamento, la riattivazione in cellule mature sarebbe il meccanismo responsabile della leucemogenesi.

In modelli murini solo l'overespressione di sPRDM16 ha delle proprietà leucemogeniche, come avviene per EVI1, bloccando il differenziamento e

aumentando la sopravvivenza dei progenitori emopoietici ed espandendo il pool di cellule staminali [86,93]. Nell'uomo gli studi sono meno conclusivi, nella maggioranza dei casi sono espresse entrambe le isoforme [84,100], in alcuni casi solo sPRDM16 [86,93] ed in altri casi è stato ipotizzato una espressione differenziale delle due forme [82].

Va infine ricordato come una significativa overespressione di PRDM16 sia stata riportata in sindromi mieloidi in assenza di riarrangiamenti visibili di PRDM16 [82,93,100].

Nel gruppo delle LAM-CN, l'overespressione sembra essere associata a mutazioni nel gene NPM1 e di FLT3-ITD [93], o di entrambi, mentre l'espressione è down-regolata nelle leucemie a prognosi favorevole [con t(8;21), inv(16), t(15;17)] e contrariamente a quanto accade per EVI1, anche nelle LAM con riarrangiamenti del gene MLL [82,93]. Nei casi di LAM-CN con espressione aberrante di PRDM16 è stata osservata una demetilazione a livello del promotore, suggerendo che una differenziale metilazione possa controllare l'espressione di PRDM16: ipotesi supportata anche da studi su LAL-T con overespressione di PRDM16 e ipometilazione della regione del promotore [93,105].

## 2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'overespressione di EVI1 e PRDM16 è stata identificata come un fattore prognostico sfavorevole nelle sindromi mieloproliferative; i principali meccanismi che determinano tale overespressione sono traslocazioni e inversioni dei loci 3q26 e 1p36 [17,30,84]. Sebbene i riarrangiamenti bilanciati possano essere facilmente identificati tramite citogenetica convenzionale, la localizzazione distale li rende geni candidati per coinvolgimenti criptici [43,102,103] soprattutto in presenza di materiale con scarsa morfologia. Data la prognosi particolarmente sfavorevole è importante confermare la presenza di un riarrangiamento di questi due geni in presenza di alterazioni 1p e 3q.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di identificare e caratterizzare i riarrangiamenti dei geni EVI1 e PRDM16 tramite FISH in pazienti che presentavano rispettivamente alterazioni del braccio 3q e 1p;

valutare l'espressione dei geni EVI1 e PRDM16 in questi pazienti e nei gruppi citogenetici con cariotipo normale (LAM-CN) e con alterazioni -7/7q-, e correlarla con i dati di FISH;

correlare le caratteristiche citogenetico-molecolari con quelle clinico-biologiche.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Casistica

Lo studio è stato condotto retrospettivamente su 142 pazienti affetti da sindromi mieloproliferative afferiti al nostro istituto tra il 1992 e il 2012, che presentavano all'analisi citogenetica convenzionale alterazioni del braccio q del cromosoma 3 (n=70), alterazioni del braccio p del cromosoma 1 (n=14) e monosomia o delezione del braccio q del cromosoma 7 (n=58), e il cui materiale fosse ancora disponibile per gli studi di FISH ed espressione genica. L'età mediana dei pazienti era 61 anni (range 18-87), il rapporto tra maschi e femmine era 1:0.7. Le caratteristiche dei pazienti analizzati sono riassunte nella Tabella 8. Inoltre, l'espressione di EVI1 e PRDM16 è stata valutata in ulteriori 25 LAM-CN.

	Alterazioni 3q	Alterazioni 7q	Alterazioni 1p	Totali
<b>LAM “de novo”</b>	39	31	8	78
<b>LAM secondarie</b>	16	9	3	28
<b>Totali</b>	55	40	11	106
<b>SMD “de novo”</b>	7	12	1	20
<b>SMD secondarie</b>	6	2	2	10
<b>Totali</b>	13	14	3	30
<b>SMC</b>	2	4	/	6
<b>Totali</b>	70	58	14	142
<b>Cariotipo complesso (n,%)</b>	33(47.1)	18(31)	9(64.3)	60(42.3)
<b>Età mediana (range)</b>	57 (16-89)	61 (18-87)	64(52-84)	61(16-89)
<b>Rapporto (M:F)</b>	1:0,7	1:0,6	1:0,5	1:0,7

**Tabella 8. Caratteristiche dei pazienti**

### ***3.2 Analisi citogenetica convenzionale***

L'analisi citogenetica convenzionale viene eseguita su cellule ottenute da prelievo di midollo osseo. Vengono allestite colture cellulari con 20 milioni di cellule in 10 ml di terreno, immediatamente all'arrivo del campione e in sterilità. Il terreno contiene RPMI1640 arricchito al 30% con siero fetale bovino scomplementato, glutammina (200mM) e penicillina-streptomicina (50 I.U-50 mg/ml). Vengono allestite normalmente 2 colture diverse per paziente, le quali vengono incubate per 24 e 48 ore, rispettivamente, a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine dell'incubazione si aggiungono 80 µl di colchicina e si lasciano nuovamente a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> per 40 minuti. L'aggiunta di 80 µl di colchicina, durante gli ultimi minuti di coltura, determina il blocco delle cellule in profase e/o prometafase e/o metafase. In seguito, le colture sono centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti in modo da ottenere un "pellet cellulare" e un sovrnatante che viene rimosso. Poi, il pellet viene sottoposto ad un trattamento ipotonico aggiungendo 8 ml di soluzione KCl 0,075M e miscelato accuratamente. Dopo 10 minuti di incubazione a 37°C, il materiale viene centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm e il sovrnatante ottenuto viene nuovamente eliminato. Al pellet così ottenuto si aggiungono 5 ml di fissativo costituito da acido acetico e alcool metilico nella proporzione 1:3, agitando contemporaneamente sul vortex. Il materiale viene centrifugato per altri 10 minuti a 1200 rpm, il sovrnatante è eliminato ed il pellet sottoposto a 3 lavaggi con fissativo fresco in modo da eliminare il materiale cellulare superfluo, che potrebbe ostacolare l'analisi delle piastre metafasiche. Dopo il terzo lavaggio, il pellet viene sospeso in fissativo e si allestiscono due vetrini, per ogni campione, con qualche goccia di materiale. I vetrini sono "invecchiati" in

termostato a 60°C da 1 a 3 giorni e poi colorati mediante bandeggio cromosomico G.

### ***3.3 Tecnica di bandeggio cromosomico***

Il bandeggio cromosomico prevede l'utilizzo di diverse metodiche in grado di evidenziare un pattern di bande chiare e scure sulla struttura cromosomica e specifica per ogni cromosoma, normalmente non visibili.

Non si tratta di un semplice artefatto, ma di un sistema per avvicinarsi ad una più approfondita conoscenza dell'organizzazione della catena di DNA quando si dispone a formare la struttura definitiva del cromosoma. I bandeggi G e Q (Giemsa e Quinacrina) sono i più usati ed evidenziano lo stesso pattern di bande. Quando si vuole avere una migliore identificazione dei tratti telomerici dei cromosomi, si ricorre al bandeggio R/T (Reverse), che fornisce un pattern opposto ai precedenti. Nel nostro laboratorio è utilizzato di norma il bandeggio GAW.

#### **3.3.1 Bandeggio GAW**

I vetrini, allestiti con le specifiche metodiche, sono immersi in una soluzione 0,2N di HCl per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, dopo essere stati sciacquati in acqua corrente, vengono immersi per 20 minuti in una soluzione di 1xSSC (soluzione di NaCl e Nacitrato) a 60°C. In seguito, ogni vetrino viene colorato con 4 ml di colorante (3 ml di tampone a pH 6,8 e 1ml di Wright' stain 0,06%) per circa 3 minuti. I vetrini sono poi esaminati al microscopio ottico e per ogni paziente vengono osservate almeno 20 metafasi alla diagnosi e 30 metafasi in

corso di terapia (Genikon 3.7.27, Nikon). L'esame di ogni metafase è effettuato attraverso un sistema di analisi computerizzato collegato al microscopio e la classificazione dei cromosomi viene eseguita secondo l'International System Chromosome Nomenclature (ISCN). Le alterazioni cromosomiche sono valutate come clonali quando: due o più cellule presentano la stessa anomalia strutturale o lo stesso cromosoma soprannumerario; tre o più cellule presentano la stessa monosomia. Le alterazioni presenti in numero inferiore di cellule sono definite non clonali.

### ***3.4 Analisi in FISH***

Gli studi di FISH sono stati eseguiti con le seguenti sonde a DNA per la caratterizzazione del gene EVI1 e del gene PRDM16.

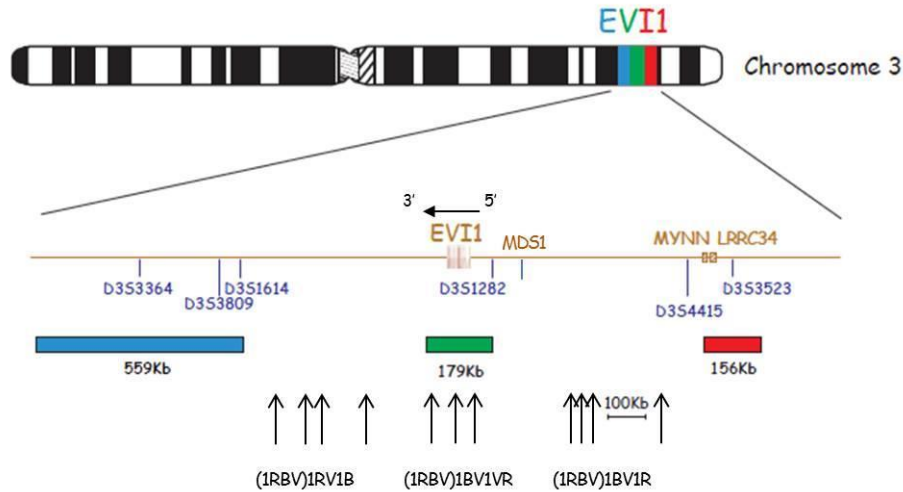
#### **3.4.1 Sonde utilizzate**

##### **Aquarius® EVI1 Tricolor Breakpart (Cytocell, Cambridge, United Kindom)**

È una miscela di tre sonde contigue, marcate con tre differenti fluorocromi (Aqua, Spectum Green e Spectrum Orange), che coprono il gene EVI1 e le regioni adiacenti. La sonda marcata con Aqua ha come target genomico una regione di circa 559 kb localizzata in posizione centromerica rispetto a EVI1 ad una distanza di circa 590 kb. La sonda marcata in Spectrum Green si estende per una distanza di 179 kb coprendo il gene EVI1 e le regioni strettamente adiacenti.

Infine la sonda marcata in Spectum Orange ha come target genomico una regione di 156 kb che contiene i geni MYNN e LRRC34 localizzata in posizione

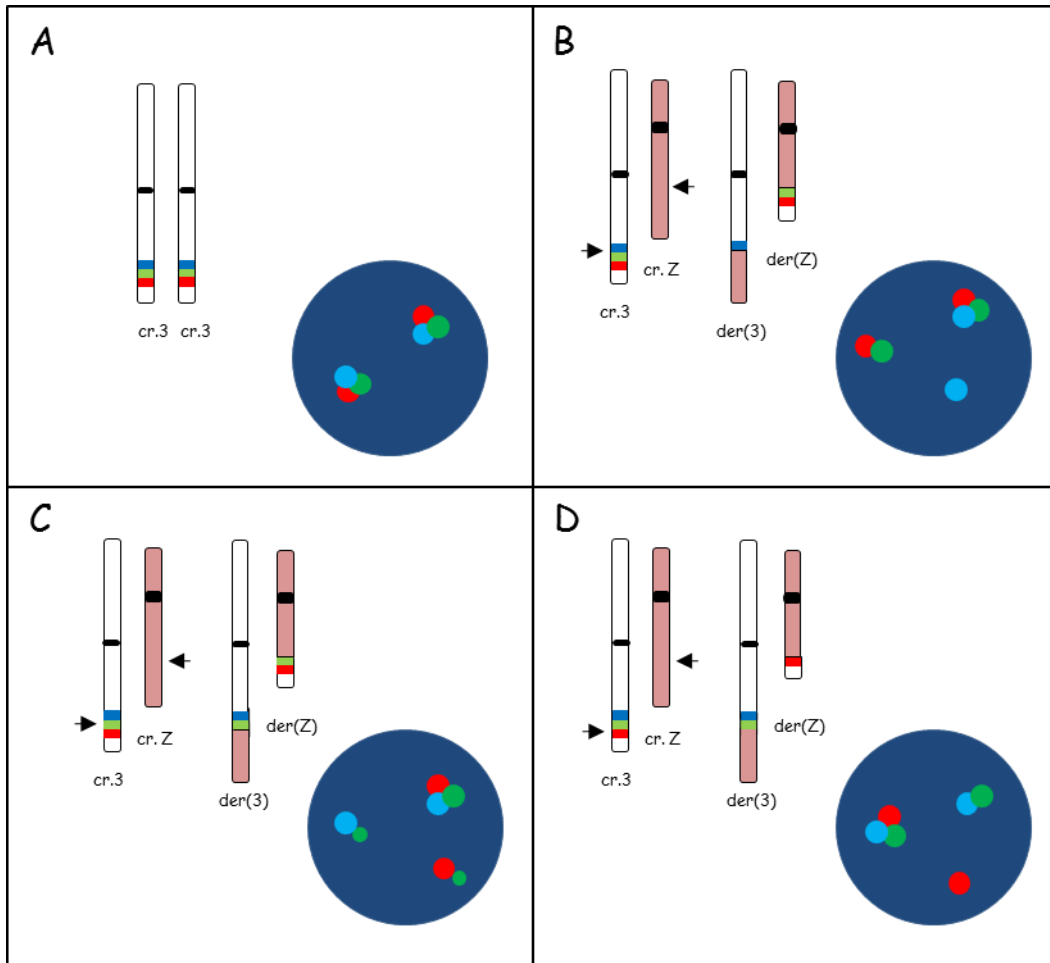
telomerica rispetto ad EVI1 ad una distanza di circa 600 kb (Fig.12).



**Figura 12. Disposizione delle sonde per EVI1 e posizione dei breakpoints con relativo pattern di FISH.** R=segnale rosso, B=segnale blu, V=segnale verde, (RBV)=segnale di fusione

Una cellula normale mostrerà 2 segnali di fusione dati dalla sovrapposizione dei segnali rosso/blu/verde (RBV) per i due cromosomi 3 normali, mentre una cellula con il riarrangiamento di EVI1 mostrerà sempre 1 segnale di fusione (RBV) che corrisponde al cromosoma 3 normale e poi, a seconda del punto in cui è avvenuto il breakpoint (centromerico, all'interno della sequenza di EVI1 o telomerico) pattern di FISH diversi (Fig.13). Questa sonda è in grado di accertare non solo il riarrangiamento di EVI1 ma anche stabilire la posizione del breakpoint rispetto ad esso.





**Figura 13. Schema dei possibili riarrangiamenti di EVI1 osservabili in FISH.** (A) Cellula normale con due segnali di fusione (rosso/blu/verde) che identifica i due cromosomi 3. (B) Riarrangiamento di EVI1 con breakpoint centromerico (3' EVI1): il segnale blu identifica il derivativo 3, mentre il segnale di fusione (verde/rosso) si localizza sul cromosoma derivativo coinvolto nella traslocazione. (C) Riarrangiamento di EVI1 con breakpoint in EVI1 (o regione strettamente adiacente): il segnale di fusione (blu/verde) identifica il derivativo 3, mentre il segnale di fusione (verde/rosso) si localizza sul cromosoma derivativo coinvolto nella traslocazione. (D) Riarrangiamento di EVI1 con breakpoint telomerico (5' di EVI1): il segnale di fusione (blu/verde) identifica il cromosoma derivativo 3, mentre il segnale rosso si localizza sul cromosoma derivativo coinvolto nella traslocazione. cr.Z= cromosoma partner coinvolto nella traslocazione con il cromosoma 3; cr.3= cromosoma 3; der(Z)= derivativo del cromosoma partner coinvolto nella traslocazione con il cromosoma 3; der(3)= derivativo del cromosoma 3. Le frecce indicano i punti di breakpoint.

**Sonde BAC per la caratterizzazione in FISH del gene PRDM16 (BlueGnome Ltd.Cambridge, United Kingdom)**

Per la caratterizzazione di PRDM16 vengono utilizzate 3 sonde ottenute da 3 cloni BAC scelti tramite Ensembl54 (<http://www.ensembl.org>). Le seguenti sonde sono fornite marcate con fluorocromi (Spectrum Green o Spectrum Orange) dalla ditta ([www.cambridgebluegnome.com](http://www.cambridgebluegnome.com)):

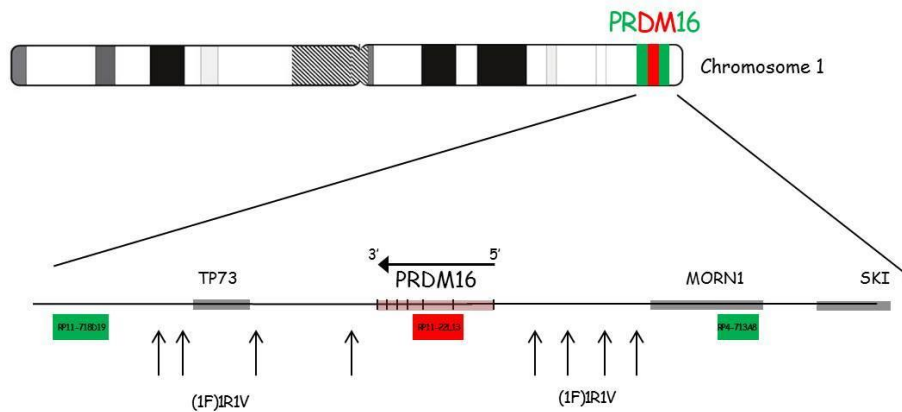
**RP4-713A8:** la sonda marcata in Spectrum Green, ha come target una regione genomica di circa 102 kb (comprendente sequenza del gene MORN1) in posizione telomerica rispetto a PRDM16 con un gap di circa 734 kb dal 5' del gene.

**RP11-22L13:** la sonda marcata in Spectrum Orange, copre una regione di circa 153 kb tra il secondo e terzo esone di PRDM16 (Fig.14).

**RP11-718D19:** la sonda marcata in Spectrum Green, ha come bersaglio una regione di circa 168 kb in posizione centromerica rispetto a PRDM16 ad una distanza di circa 663 kb dal 3' del gene.  
(Fig.14)

Infine, la sonda RP11-220M1 marcata in rosso di circa 150 kb localizzata nella regione 1p32 è stata utilizzata come controllo.

Gli esperimenti di FISH vengono eseguiti utilizzando queste sonde BAC in due diverse combinazioni; entrambe le sonde così ottenute sono di tipo breakapart.

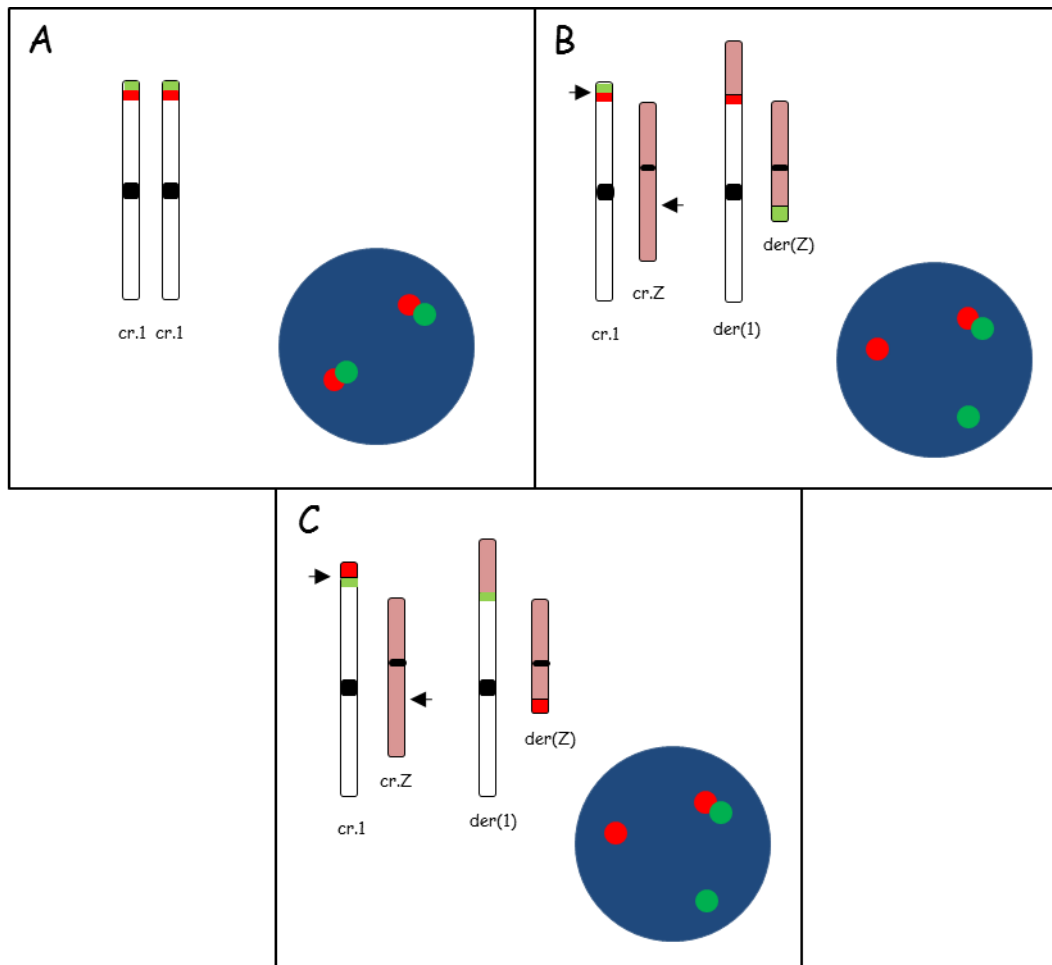


**Figura 14. Disposizione delle sonde BAC per PRDM16 e posizione dei breakpoints con relativo pattern di FISH.** F= segnale di fusione (rosso/verde), R=segnale rosso, V=segnale verde

**RP4-713A8 e RP11-22L13:** in una cellula normale avremo due segnali di fusione (2F) (giallo) (o rosso e verde molto vicini) che corrispondono ai due cromosomi 1 normali (Fig.15A), mentre in presenza di un riarrangiamento avremo 1 segnale di fusione che corrisponde al cromosoma 1 normale, un segnale rosso che corrisponde al derivativo cromosoma 1 e 1 segnale verde che corrisponde al cromosoma partner derivativo coinvolto nella traslocazione (1F1R1V). Questa combinazione consente di identificare breakpoints che avvengono al 5' del gene PRDM16 (Fig.15B).

**RP11-22L13 e RP11-718D19 :** in una cellula normale avremo due segnali di fusione (2F) (giallo) (o rosso e verde molto vicini) che corrispondono ai due cromosomi 1 normali (Fig.15A), mentre in presenza di un riarrangiamento avremo: 1 segnale di fusione che corrisponde al cromosoma 1 normale, un segnale verde che corrisponde al derivativo cromosoma 1 e 1 segnale rosso che corrisponde al cromosoma partner derivativo coinvolto nella traslocazione (1F1R1V). Questa

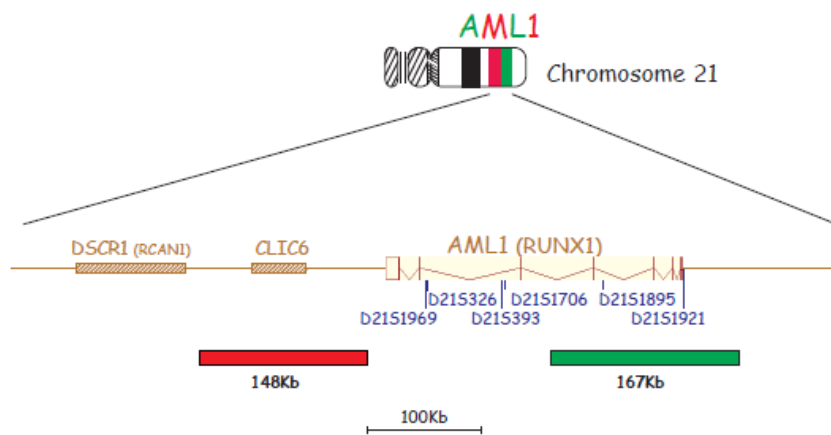
combinazione consente di identificare breakpoints che avvengono al 3' del gene PRDM16 (Fig.15C).



**Figura 15. Schema dei possibili riarrangiamenti con le sonde utilizzate per PRDM16.** (A) Cellula normale, 2 segnali di fusione (rosso/verde). (B) Riarrangiamento di PRDM16 con breakpoint telomerico, il segnale rosso (RP11-22L13) rimane sul derivativo 1, mentre il segnale verde (RP11-713A8) trasloca sul derivativo del cromosoma partner coinvolto. (C) Riarrangiamento di PRDM16 con breakpoint centromerico, il segnale rosso (RP11-22L13) trasloca sul derivativo del cromosoma partner coinvolto, mentre il segnale verde (RP11-718D19) rimane sul derivativo 1. cr(Z)=cromosoma partner; der(Z)= derivativo del cromosoma partner coinvolto nella traslocazione con il cromosoma 1; cr(1)=cromosoma 1; der(1)= derivativo del cromosoma 1. Le frecce indicano i punti di breakpoints.

### **AML1 Breakapart (Cytocell, Cambridge, United Kindom)**

E' una miscela di due sonde contigue, una sonda marcata in Spectrum Orange di circa 148 kb posta al 5' del gene AML1(RUNX1) e una sonda marcata in Spectrum Green di circa 167 kb che ha come target una parte del gene e una porzione al 3'.



**Figura 16. Disposizione delle sonde per AML1(RUNX1)**

Una cellula normale mostrerà 2 segnali di fusione per i 2 cromosomi 21 normali, mentre in una cellula con riarrangiamento si evidenzierà un segnale di fusione per il cromosoma 21 normale, un segnale rosso che identificherà il derivativo ed un segnale verde che identificherà il derivativo del cromosoma partner coinvolto nella traslocazione con il cromosoma 21 (Fig.16).

### **3.4.2 Metodica FISH**

I vetrini sono allestiti con il materiale ottenuto dalla preparazione e citogenetica, conservato a -20°C. In seguito, vengono pretrattati per 2 minuti a temperatura ambiente in 2XSSC (17,5g di cloruro di sodio e 8,2g di citrato tri-sodico in

1 litro di acqua distillata).I vetrini sono poi deidratati in lavaggi successivi di 2 minuti ciascuno in etanolo a percentuali crescenti: 70%, 80% e 100%.

La sonda di EVI1 viene fornita 'ready to use' ed è sufficiente quindi porre 5µl o 10µl (a seconda dell'area che si vuole coprire) della sonda su ogni vetrino.

Per PRDM16 invece una soluzione di ibridizzazione viene preparata con 12µl di tampone e 1µl di ciascuna sonda (fino ad un massimo di 3 sonde), 5µl o 10 µl di tale miscela vengono posti su ogni vetrino.

I vetrini si dispongono nella macchina Hybrite (Vysis Inc.,Richmond, United Kingdom) (che funge da camera umida e buia) dove avviene una co-denaturazione di sonda e di DNA bersaglio a 75°C per 3 minuti. Subito dopo avviene l'ibridizzazione, overnight a 37°C, tra DNA della sonda e DNA bersaglio.

Al termine dell'overnight, i vetri sono lavati per 2 minuti in una soluzione di 0.4XSSC a 72°C, quindi in una soluzione 2XSSC e 0,1% NP-40 a temperatura ambiente per 30 secondi. I vetrini, lasciati asciugare all'aria, vengono controcolorati con 4,6 diamino-2-phenylindole (DAPI III) e in seguito osservati al microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri a singola banda FITC/TRITC/AQUA/DAPI.

Vengono analizzate, dove possibile, almeno 200 cellule alla diagnosi e 300 cellule in corso di terapia per vetrino da due operatori indipendentemente (Eclipse E1000, Nikon). Un caso si considera negativo, quando la percentuale dei nuclei positivi per lo specifico riarrangiamento è inferiore al 4% (cut-off).

### ***3.5 Analisi di espressione genica***

#### **3.5.1 Separazione su Ficoll**

Cinque ml di sangue midollare e/o 20 ml di sangue periferico in EDTA, vengono separati su gradiente di densità (Ficoll-Paque). Il sangue midollare, in precedenza filtrato con ago da insulina e il sangue periferico sono diluiti con soluzione fisiologica in rapporto 1:4 e 1:2, rispettivamente, e stratificati in provette contenenti Ficoll (rapporto 1:4). Dopo centrifugazione (1500 rpm per 25 minuti), l'anello della frazione mononucleata viene raccolto e sottoposto a due lavaggi con soluzione fisiologica (1800 rpm per 10 minuti). Infine, il surnatante viene eliminato ed il pellet risospeso in 500µl di RLT (soluzione per la conservazione degli acidi nucleici) e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

#### **3.5.2 Estrazione di DNA e RNA**

Per l'estrazione di DNA e RNA da cellule mononucleate viene utilizzato un kit (Allprep DNA/RNA Mini Kit; Qiagen) che consente di estrarre simultaneamente il DNA genomico e l'RNA totale da un singolo campione. Un volume di 350 µl di cellule mononucleate conservate in RLT a -20°C, dopo risospensione con siringa da tuberculina, viene trasferito in una mini-colonna (Allprep DNA) fornita dal kit e centrifugato a 10000 rpm per 30 secondi. Il DNA viene trattenuto nella membrana della colonna, mentre l'RNA filtra attraverso la membrana ed è così raccolto nella provetta sottostante. L'estrazione dell'RNA viene effettuata con l'utilizzo dell'estrattore semi-automatico QIAcube (Qiagen). L'RNA totale ottenuto viene risospeso in 30µl di H<sub>2</sub>O. Per l'estrazione del DNA si procede con

due lavaggi con i buffer AW1 e AW2 per 15 secondi a 10000 rpm e 2 minuti a 13000, rispettivamente, per eliminare i contaminanti. Vengono fatte due eluizioni di DNA successive, aggiungendo 50µl di buffer EB direttamente sulla membrana della colonna e incubando 1 minuto a temperatura ambiente prima di centrifugare per 1 minuto a 10000 rpm.

Il DNA e l'RNA, così ottenuti, vengono dosati allo spettrofotometro ND-1000 (Nanodrop Technologies), per stabilire la concentrazione, e conservati a -20°C.

### **3.5.3 Sintesi del cDNA**

L'RNA estratto, a singolo filamento, viene convertito in cDNA, a doppio filamento, mediante la reazione di retrotrascrizione, che sfrutta l'attività dell'enzima DNA polimerasi RNA dipendente (trascrittasi inversa), capace di sintetizzare DNA avendo come template RNA.

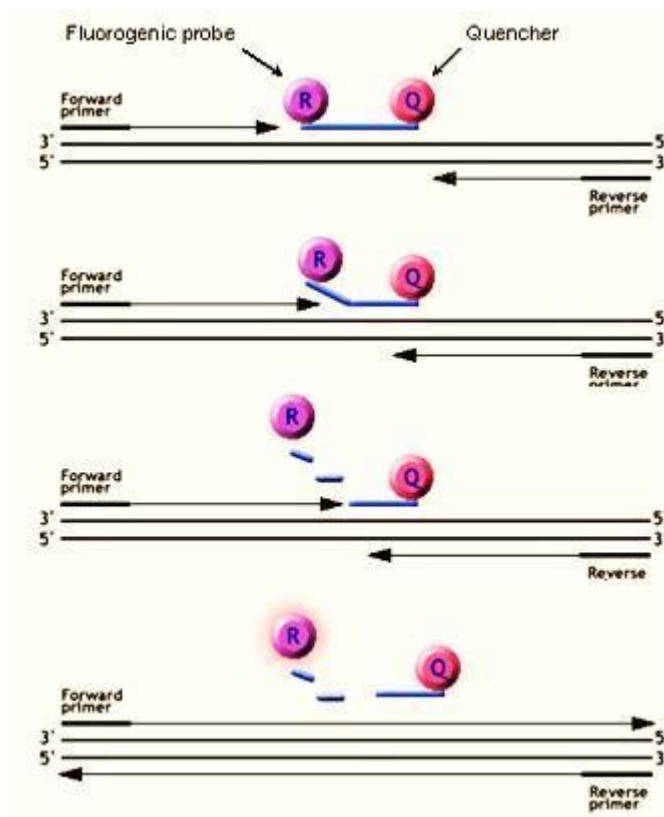
L'RNA di partenza (1µg) è dapprima denaturato per 5 minuti a 70°C e successivamente posto in ghiaccio per almeno 10 minuti. La retrotrascrizione è realizzata in un volume finale di 20µl di reazione, contenente 5µM di Random Examers (Applied Biosystem), 1µg di RNA, 4mM di DDT (Invitrogen), 200µM di ciascun deossinucleotide trifosfato (Invitrogen), 4µl di RT buffer 5x (Invitrogen) e 200U di Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (mMLV) (Invitrogen). La reazione di retrotrascrizione viene eseguita facendo un'incubazione per 60 minuti a 37°C e successivamente per 5 minuti a 95°C. Il cDNA viene mantenuto a -20°C fino al momento dell'uso.



### **3.5.4. Metodica di RQ-PCR**

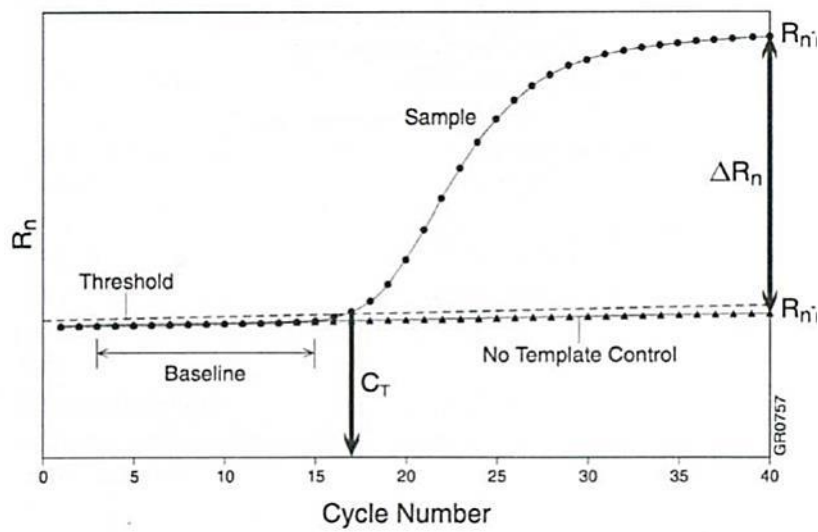
La Real-time PCR è una tecnica che permette contemporaneamente l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato: si può monitorare la quantità di cDNA durante la fase esponenziale di crescita (quando l'efficienza dipende dalla concentrazione iniziale del template ed è minimamente influenzata dalle variabili di reazione) per consentire una quantificazione del template di partenza. Questo è possibile grazie all'impiego di marcatori fluorescenti, ad esempio coloranti intercalanti (come il SYBR green) che si legano in maniera aspecifica a tutto il DNA, oppure sonde specifiche per il frammento d'interesse marcate con molecole fluorescenti (Taqman).

Nella Real-Time PCR basata sull'utilizzo delle sonde Taqman oltre ai primers specifici per il frammento che si vuole amplificare, viene aggiunta alla reazione una sonda complementare ad un tratto della sequenza di interesse, legata covalentemente a 2 molecole fluorescenti, un Reporter (R) al 5' (FAM, fluorocromo ad alta energia) che, eccitato ad una determinata lunghezza d'onda, emette fluorescenza e un Quencer (Q) al 3' (TAMRA, fluorocromo a bassa energia) che la sopprime, poiché assorbe i fotoni emessi da R. La condizione perché ciò avvenga è la vicinanza tra R e Q. Durante la reazione di amplificazione, l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi in presenza di un doppio filamento, dato dall'appaiamento tra sonda Taqman e frammento bersaglio, determina la degradazione della sonda, con allontanamento di R da Q e generazione del segnale di fluorescenza (Fig. 17). I valori di fluorescenza, registrati durante ogni ciclo di amplificazione, sono direttamente correlati alla quantità di prodotto amplificato fino ad un dato momento.



**Figura 17: RQ-PCR.**

La variazione della fluorescenza necessaria per determinare il numero di molecole contenute nel campione analizzato viene calcolato come  $R_n = R(+)-R(-)$ :  $R(+)$  è la fluorescenza del campione analizzato, normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX (un fluorocromo il cui rapporto con la luminosità del campione serve per ridurre l'errore);  $R(-)$  è la fluorescenza del Not Template Control (NTC), normalizzata rispetto a ROX. Per ogni campione si otterrà un grafico con la curva di crescita, che partirà tanto prima quanto maggiore è la quantità di template di partenza (Fig.18).



**Figura 18. Plot di amplificazione**

Nella curva di amplificazione si evidenziano la Threshold, cioè la linea soglia scelta in fase di reazione esponenziale, che interseca le curve di tutti i campioni, e il ciclo soglia ( $C_t$ , Threshold Cycle), cioè il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è significativamente maggiore rispetto a quello della Threshold, poiché avviene il primo significativo aumento della fluorescenza (Fig.18). Esistono due metodi principali per la quantificazione: uno assoluto, che si basa sull'utilizzo di una serie di diluizioni standard a concentrazioni note della sequenza studiata, per cui la concentrazione è considerata come valore assoluto, e un metodo relativo, in cui si confronta il  $C_t$  del campione con quello di un campione di riferimento detto anche calibratore. Per minimizzare gli errori e la variabilità data dalla qualità dell'RNA o dall'efficienza di retrotrascrizione, è necessario utilizzare un controllo endogeno. Tale controllo deve essere un gene espresso in modo costante in tutti i tessuti e normalmente vengono utilizzati i geni house-

keeping o i geni delle subunità ribosomiali. Quindi, una volta normalizzato la quantità di cDNA target con un controllo endogeno si ottiene un  $\Delta C_t$  (differenza di  $C_t$  fra gene target e gene di controllo) del campione che viene comparato con il  $\Delta C_t$  del campione di riferimento ottenendo un  $\Delta\Delta C_t$  ( $\Delta C_{t_{\text{campione}}} - \Delta C_{t_{\text{campione-riferimento}}}$ ). Il valore di concentrazione relativa del target viene espresso come  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . La quantificazione Real Time relativa mediante ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystem) viene utilizzata per quantificare i livelli dei trascritti di EVI1 e PRDM16, utilizzando primers e sonde specifiche (Applied Biosystem) (Tab.9). Ciascun esperimento è condotto in duplicato, in un volume finale di 25  $\mu$ l, utilizzando 12,5  $\mu$ l di Universal Master Mix 2X (Applied Biosystem), primers, sonda TaqMan (Taqman Gene Expression Assay) (Tab. 9) e 5  $\mu$ l del cDNA in esame. Come gene di controllo interno viene utilizzato il GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato- deidrogenasi), mentre come campione di riferimento l'Universal Human Reference RNA (Stratagene), composto dall'RNA totale di 10 linee cellulari umane. Le condizioni della reazione di amplificazione sono le seguenti: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, 95°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto, il tutto ripetuto per 50 cicli. L'acquisizione dei dati avviene esclusivamente in fase di elongazione (a 60°C).

<b>TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystem)</b>	<b>Specificità</b>
Hs00602795_m1	MECOM ex 15-16
Hs01115415_m1	MECOM ex 5-6
Hs00922674_m1	PRDM16 ex 4-5
Hs00223161_m1	PRDM16 ex 14-15

**Tabella 9. Assays utilizzati per l'analisi di espressione e loro specificità.**

### ***3.6. Analisi statistiche***

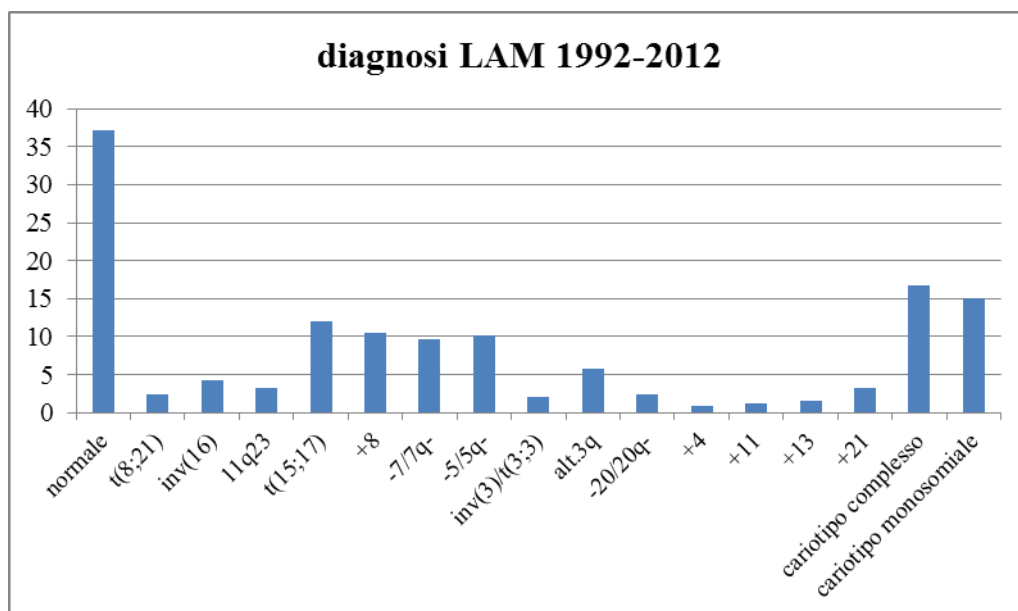
I valori di  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  sono considerati essere overespressi se superiori alla media di  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  più 3 deviazioni standard di 10 controlli normali di midollo osseo o 10 controlli normali di sangue periferico. I confronti tra le caratteristiche cliniche e citogenetiche dei gruppi di pazienti sono svolti utilizzando il test di Fisher (variabili discrete) e il test di Mann-Whitney (Wilcoxon della somma dei ranghi) (variabili continue). Sono considerati significativi  $p < 0.05$ . Tutte le analisi statistiche sono svolte utilizzando il programma Graph Pad Prism 6 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

## 4.RISULTATI

### 4.1 Analisi citogenetica convenzionale

#### 4.1.1 Frequenza alterazioni citogenetiche nelle LAM

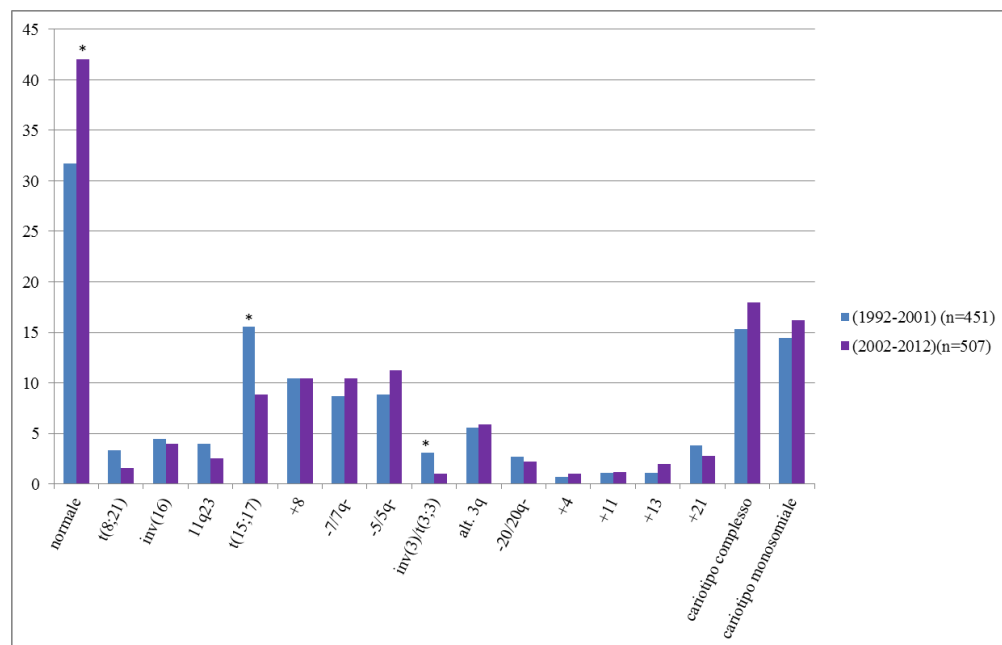
Dall'inizio del 1992 alla fine del 2012, sono stati valutati in citogenetica nel nostro istituto 958 casi di LAM alla diagnosi. L'età media dei pazienti era 57 anni (18-87) e il rapporto maschi/femmine era 1/0.8. Le frequenze riportate per le singole alterazioni più frequenti erano simili a quelle riportate in letteratura con eccezione per la t(8;21) la cui frequenza si discostava significativamente da quelle riportate nella letteratura (2% vs 6%) (Fig.19).



**Figura 19. Alterazioni citogenetiche con una frequenza superiore allo 0,5%**

La frequenza dell'inv(3)/t(3;3) era circa del 2% in accordo con quanto riportato in

letteratura [30,31]; le alterazioni del 3q rappresentavano invece un 5,7% di tutte le LAM diagnosticate (Fig.19). Per valutare eventuali variazioni nella frequenza delle alterazioni citogenetiche, l'intervallo preso in esame è stato suddiviso in due periodi temporali: uno dal 1992 al 2002 e l'altro dal 2002 al 2012. Sono state confrontate le frequenze delle alterazioni citogenetiche riguardanti i due periodi (Fig.20).

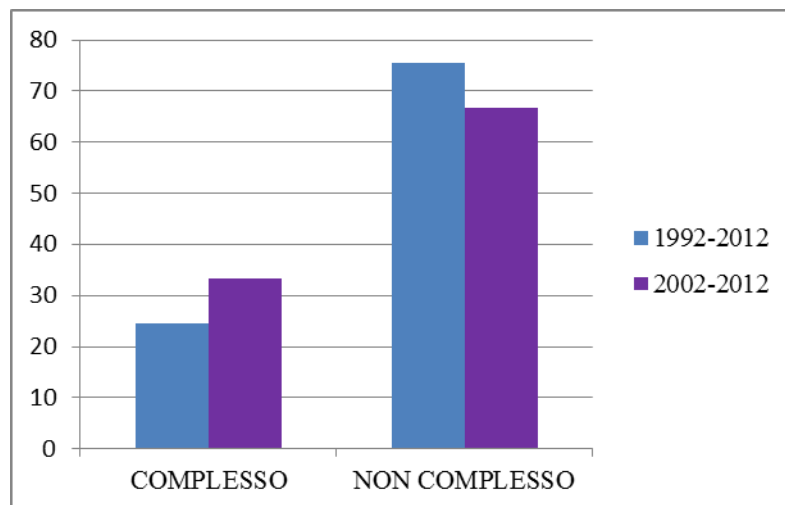


**Figura 20. Frequenze delle alterazioni citogenetiche nei due periodi di tempo.**

\* gruppi con differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )

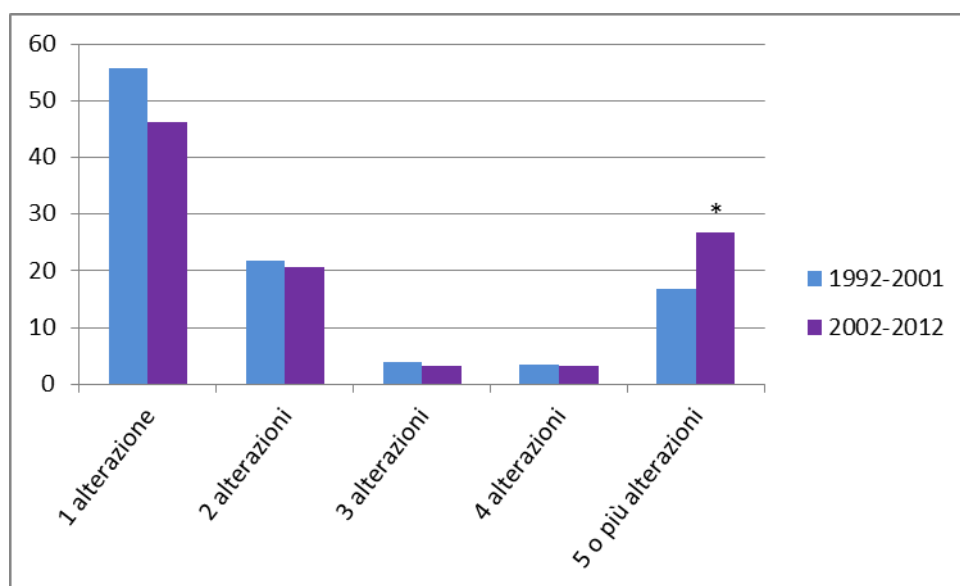
Le variazioni statisticamente significative sono state rilevate nel gruppo a cariotipo normale, quello con t(15;17) e quello con inv(3)/t(3;3); con aumento delle LAM-CN e una diminuzione dei casi con t(15;17) e inv(3)/t(3;3). Rispetto alla complessità del cariotipo, considerandolo complesso con 3 o più alterazioni in assenza di t(15;17), t(8;21) e inv(16), la differenza è risultata essere

statisticamente significativa (Fig.21).



**Figura 21. Valutazione delle frequenze dei cariotipi complessi vs no complessi**

In particolare considerando il numero di alterazioni è emerso che la differenza in significatività osservata è dovuta all'aumento della frequenza dei cariotipi complessi con un numero di alterazioni uguale o superiore a 5 (Fig.22).

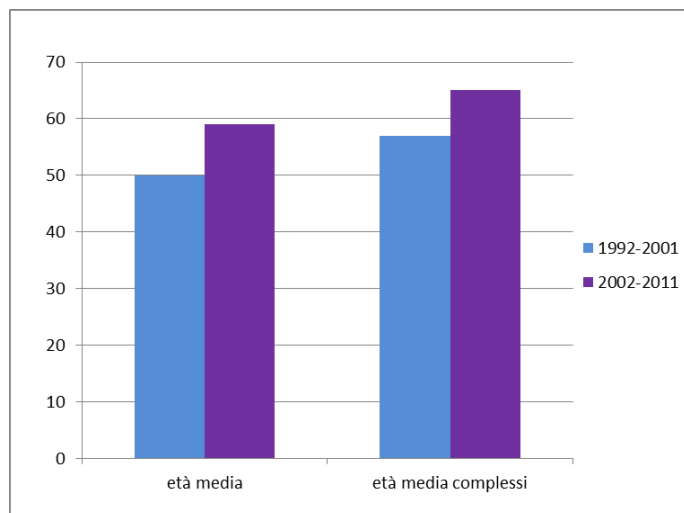


**Figura 22. Valutazione della frequenza del numero di alterazioni per cariotipo.**

\* gruppi con differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ )



Confrontando l'età media dei pazienti nel primo e secondo periodo di tempo è risultato un aumento statisticamente significativo dell'età media nel secondo periodo. (Fig.23).



**Figura 23. Età dei pazienti nei due periodi di tempo considerati**

#### **4.1.2 Alterazioni del braccio 3q**

I pazienti che presentavano alterazioni del braccio cromosomico 3q in CC sono stati suddivisi in 4 gruppi (A-D) in base alle alterazioni 3q riportate (Tab. 10). Il gruppo A (n=23) che comprendeva inv(3)(q21q26) (n=18) e la t(3;3)(q21;q26) (n=4). Il gruppo B (n=11) includeva altre traslocazioni bilanciate 3q26 come ad esempio la t(3;21)(q26;q22). Il gruppo C (n=11) comprendeva altri riarrangiamenti 3q21 bilanciati come la t(1;3)(p36;q21). Il gruppo D (n=25) includeva tutte le restanti alterazioni (es. del(3q), der(3q), ins(3), -3, etc.). Le alterazioni del cromosoma 7 (-7/7q-) erano le alterazioni aggiuntive più frequenti. Nel gruppo A, le alterazioni -7/7q- erano presenti in 15 pazienti su 23 (61%); alterazioni del

cromosoma 5 erano invece più rare (13%) e rappresentavano la seconda alterazione addizionale più frequente, in 6 pazienti (26%) l'inv(3)/t(3;3) era isolata, mentre 2 pazienti presentavano un cariotipo complesso. Alterazioni del cromosoma 7 erano frequenti anche nei restanti gruppi, 5 casi su 12 (42%) nel gruppo B, 4 su 10 (40%) nel gruppo C, e 16 su 25 (64%) nel gruppo D, dove erano frequenti alterazioni del cromosoma 5 (13 su 25 (52%)). Il cariotipo complesso era presente nella maggioranza dei casi (76%) del gruppo D, mentre era meno frequente negli altri gruppi.

#### **4.1.3 Alterazioni del braccio 1p**

Tra i 14 pazienti che presentavano alterazioni del braccio 1 p, le alterazioni ricorrenti erano la t(1;3)(p36;q21) (n=3), la dup(1)(p22p36) (n=2); i restanti pazienti mostravano varie alterazioni tra cui la più frequente era add(3)(p36) (n=3).

#### **4.1.4 Alterazioni del cromosoma 7**

Alterazioni del cromosoma 7 si presentavano in 35 su 58 casi (60.4%), come singola alterazione, in 5 casi (8.6%) con una sola alterazione associata ed in 18 pazienti (31%) all'interno di un cariotipo complesso. La monosomia 7 era presente in 38 casi (di cui 12 con un cariotipo complesso), mentre le delezioni del braccio q erano presenti in 20 casi, di cui 12 con cariotipo complesso.

## 4.2 Riarrangiamenti di EVI1

### 2.1 FISH interfaseica (I-FISH)

Riarrangiamenti di EVI1 sono stati identificati in FISH in un totale di 34 pazienti: 33 pazienti appartenevano al gruppo con alterazioni del braccio 3q, in dettaglio: 19 pazienti appartenevano al gruppo A (inv(3)/t(3;3)); 8 pazienti appartenevano al gruppo B (t(3q26)); 4 appartenevano al gruppo C(t3q21) e 2 pazienti al gruppo D (varie). Mentre 1 solo paziente apparteneva al gruppo citogenetico con alterazioni del cromosoma 7 (senza apparente coinvolgimento della regione 3q in CC) (Tab.10).

	Casi valutabili in FISH e/o RQ-PCR	EVI+ in FISH	EVI1+ totali (FISH+RQ-PCR)
<b>Alterazioni cromosoma 3q</b>			
<b>Gruppo A (inv(3)/t(3;3))</b>	23	19	21
<b>Gruppo B (t(3q26))</b>	11	8	8
<b>Gruppo C (t(3q21))</b>	11	4	4
<b>Gruppo D (varie)</b>	25	2	2
<b>Totali</b>	70	33	35
<b>Alterazioni cromosoma 7</b>			
<b>non complessi</b>	40	1	9
<b>complessi</b>	18	-	1
<b>Totali</b>	58	1	10

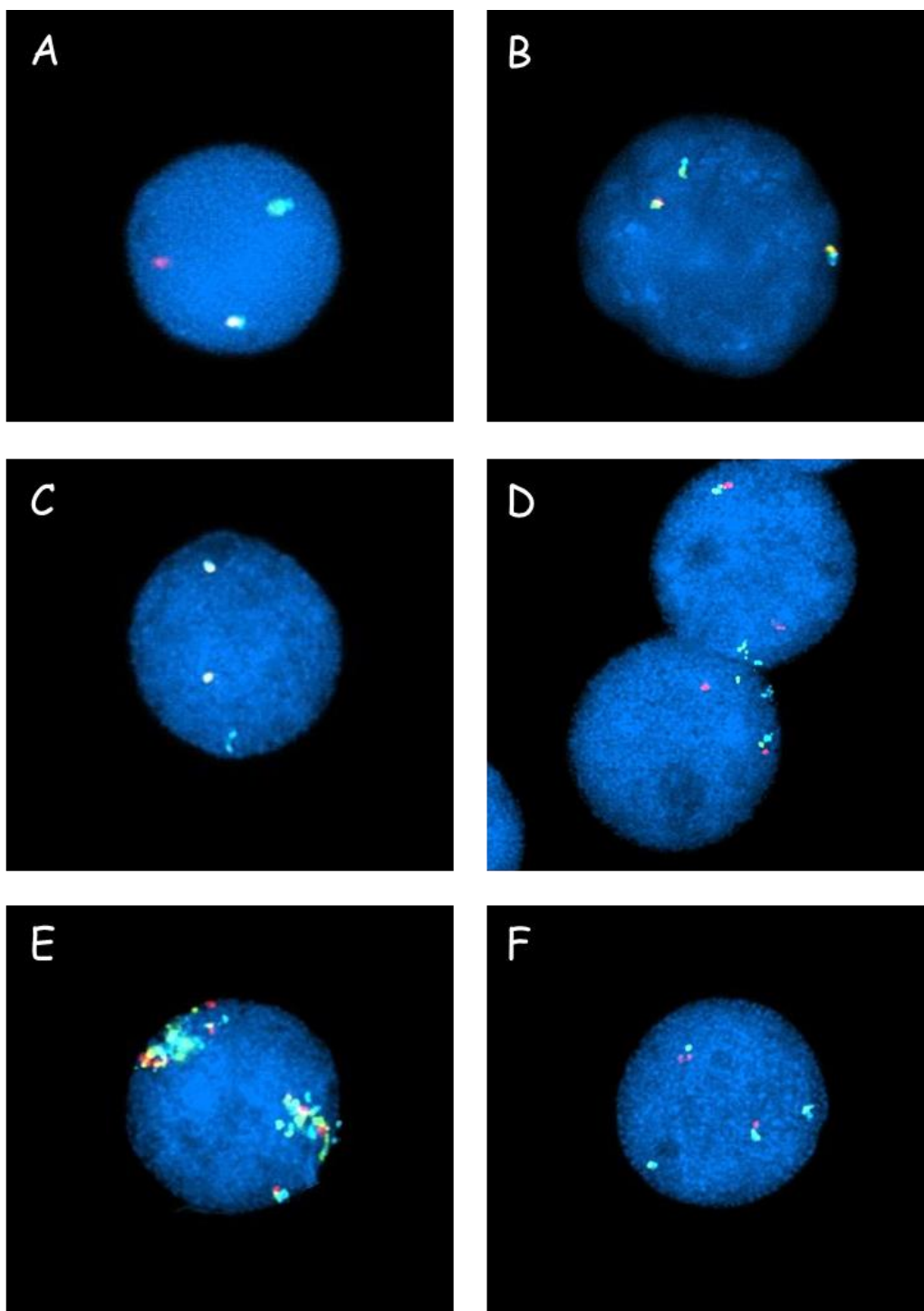
**Tabella 10. Casistica dello studio**

Analizzando i casi in I-FISH i breakpoints erano distribuiti al 5' di EVI1 (n=13) (Fig.24A) al 3' di EVI1 (n=12) (Fig.24C), all'interno di EVI1 (n=7) (Fig.24B) e sia al 5' che al 3' (n=1) (Fig.24D) (Tab.11). In tutte le inv(3) i breakpoints erano

distribuiti al 3' di EVI1, in alcuni casi il breakpoint era molto vicino al 3' del gene o all'interno del gene stesso. Invece, nelle traslocazioni i breakpoints erano più frequentemente al 5' di EVI1 (11/13); in soli 2 casi, una  $t(3;21)(q26;q22)$  e una  $t(1;3)(q32;q26)$  (n.22 e 26; Tab.11) era presente un breakpoint molto vicino al 3' o all'interno del gene. Due pazienti presentavano un pattern in I-FISH particolare: in un caso con  $t(3;21)$  si evidenziava l'amplificazione di un segnale di riarrangiamento (Fig.24F) e un caso di  $t(3;8)(q26;q24)$  mostrava tre segnali (R, B e V) separati (Fig.24D) ad indicare multipli breakpoint nella regione 3q26. Un paziente con un  $der(7)$  (n.37;Tab.11) presentava un'amplificazione di EVI1 in un clone (50% delle cellule) non identificato in CC convenzionale (Fig.24E).

In aggiunta ai casi che presentavano riarrangiamenti di EVI1 in FISH, si osservava l'acquisizione di un segnale di fusione, che identifica il locus del gene per EVI1, in 6 pazienti e, al contrario, la perdita di un segnale di fusione in altri 6 pazienti. Dei 6 pazienti che presentavano 3 segnali per EVI1, 4 pazienti appartenevano al gruppo D e presentavano, in CC, derivativi del cromosoma 3, in 3 di questi casi era presente un'amplificazione del braccio q ( $3q21 \rightarrow 3qter$ ) ed era la sola alterazione presente. I restanti 2 pazienti con triplo segnale di fusione appartenevano al gruppo con alterazioni del cromosoma 7 e presentavano un cariotipo complesso.

Dei 6 pazienti che presentavano la perdita di un segnale per EVI1: 2 avevano la monosomia del cromosoma 3 in CC e 4 casi mostravano una delezione 3q.



**Figura 24. Riarrangiamenti di EVI1 in I-FISH.** (A) Riarrangiamento con breakpoint al 5' del gene. (B) Riarrangiamento con breakpoint prossimo al 3' o all'interno del gene. (C) Riarrangiamento con breakpoint al 3'. (D) Riarrangiamento variante con breakpoint al 5' e al 3' del gene. (E) Amplificazione di EVI1. (F) Riarrangiamento all'interno del gene EVI1 con amplificazione del riarrangiamento (segnale blu/verde)

N	Età	Sesso	Patologia	Cariotipo	FISH	RQ-PCR (2 <sup>-2ΔΔCt</sup> ) <sub>+</sub>	Follow-up(mesi)
<b>Gruppo A (inv(3)/t(3;3))</b>							
1	45	F	M2-M4	46,XX, inv(3)(q21q26)(20)	1RBV1RV1B	-	18†
2	48	M	M2-M4postSMD	45,XY,inv(3)(q21q26),-7(20)	1RBV1RV1BV	<b>43,9</b>	14†*
3	44	M	M2-M4	45,XY,inv(3)(q21q26),-7(20)	1RBV1RV1B	<b>47,7</b>	2†
4	51	M	M4	46,XY,inv(3)(q21q26)(2)/45,XY,inv(3)(q21q26),-7(23)	1RBV1RV1B	-	10†*
5	49	M	M4	45,XY,inv(3)(q21q26),-7 (20/20)	1RBV1RV1B	-	2†
6	41	F	M7	46,XX,inv(3)(q21q26)(26)/47,XX,inv(3)(q21q26),+15(3)	1RBV1RV1B	-	4†
7	42	M	M post SMD	45,XY,inv(3)(q21q26),-5,del(7)(q22q34)(20)	1RBV1RV1B	-	6†
8	27	F	M5b	45,XX,inv(3)(q21q26),-7(20)	1RBV1RV1BV	<b>2,7</b>	18†
9	40	F	M4	45,XX,inv(3)(q21q26),-7(20)	1RBV1RV1B	<b>32,9</b>	5†*
10	49	F	M	45,XX,inv(3)(q21q26),-7(20)	1RBV1RV1BV	<b>40,1</b>	19†*
11	62	M	M	46,XY,inv(3)(q21q26),del(20)(q12)(1)/45,XY,inv(3)(q21q26),-7,del(20)(q12)(24)	1RBV1RV1B	<b>74,4</b>	6†
12	54	M	AREB-2	46,XY,inv(3)(q21q26)(20)	1RBV1RV1B	<b>46,9</b>	22†
13	42	M	M1	46,XY,inv(3)(q21q26)(20)	1RBV1RV1B	<b>51,7**</b>	15†*
14	29	F	M2secAREB	46,XX,inv(3)(q21q26)(20)	1RBV1RV1BV	<b>51,3</b>	3†
15	43	F	M1	46,XX,inv(3)(q21q26)(20)	1RBV1RV1B	<b>5,3</b>	10†
16	43	M	M0-M1	45,XX,inv(3)(q21q26),-7 (20)	-	<b>41,2</b>	10†
17	66	M	SMDpostLNH	45,XY,inv(3)(q21q26),der(5),-7, add(18)(q23)(10)/45,XY,der(5),-7,der(11)t(11;11)(p15;q13), add(18)(q23)(6)/46,XY,der(5),del(7q),der(11)t(11;11)(p15;q13),add(18)(q23)(4)	1RBV1RV1BV		2
18	27	F	M	45,XX,t(3;3)(q21;q26),-7(20)	1RBV1R1BV	<b>27,5</b>	23†*
19	36	M	M0-M1	45,XY,t(3;3)(q21;q26),-7 (20)	1RBV1R1BV	-	62†*
20	68	M	MpostLNH	45,XY,t(3;3)(q21;q26),-7 (20)	1RBV1R1BV	<b>8,2</b>	2
21	16	F	M2	46,XX,t(3;3)(q21;q26)(20)	-	<b>17,6</b>	27†

**Tabella 11. Caratteristiche dei pazienti con riarrangiamenti di EVI1. (continua)**

N	Età	Sesso	Patologia	Cariotipo	FISH	RQ-PCR (2 <sup>-ΔΔCt</sup> ) <sub>+</sub>	Follow-up(mesi)
<b>Gruppo B t(3q26)</b>							
22	71	M	SMDpostlinfoma	46,XY,t(3;21)(q26;q22),der(3)t(3;21)(q26;q22),der(7)t(3;7)(q21;q31) (20)	1RBV1RV2BV	-	NV
23	68	M	MSec	46,XY,t(3;21)(q26;q22)	1RBV1R1BV	23,5	1†
24	63	F	Mpostlinfoma	45,XX,t(3;21)(q26;q22),der(5q),-7,del(12)(p11p13)(15)/45,XX,t(3;21)(q26;q22),der(5q),-7,del(11)(p13p15),del(12)(p11p13)(3)	1RBV1R1BV	9,9	NV
25	69	M	Msec	46,XY,inv(3)(p13q26)(20)	1RBV1RV1B	30,3	NV
26	30	M	SMD postM3	45,XY,t(1;3)(q32;q26),-7 (20)	1RBV1RV1BV	25,0	122*
27	50	F	SMC	46,XX,t(2;3)(p21;q26) (20)	1RBV1R1BV	-	NV
28	70	M	M	46,XY,t(3;8)(q26;q24),del(7)(q11q36)(20)	1RBV1R1B1V	17,5	18†
29	57	F	SMDpostlinfoma	46,XX,t(1;21)(p36;q22)(9)/46,XX,t(3;21)(q26;q22)(11)	1RBV1R1BV	-	12
<b>Gruppo C t(3q21)</b>							
30	64	M	SMD	47,XY,+8(17)/46,XY, t(3;21)(q21;q22),(2)	1RBV1R1BV	27,4	21†
31	81	M	SMD	46,XY,t(3;21)(q21;q22),del(5)(q13q33),-7(20)	1RBV1R1BV	-	3†
32	34	M	M0-M1	45,XY,t(3;14)(q21;q24),-7(21)/46,XY,t(3;14)(q21;q24),-7,+21(9)	1RBV1R1BV	16,8	11†
33	50	M	M4	46,XY,t(3;14;16)(q21;q24;q24),-7,t(7;21)(q36;q11) (20)	1RBV1R1BV	21,0	11*
<b>Gruppo D (varie alterazioni 3q)</b>							
34	76	M	M2	42-46,XY,add(1)(q42),-3,del(5)(q13q33),del(7)(q22),t(12;13)(p12;q12),-13,del(14)(q24),add(17)(p13),add(21)(q22),+22,+1-2Ms(9)	1RBV1R1BV	-	2†
35	69	F	M	45,XX,t(1;3;13)(p34;q?;q14),-7(20)	1RBV1R1BV	16,4	12†
<b>Alterazioni cromosoma 7</b>							
36	79	M	M	46,XY,del(5)(q13q31),der(7)del(7)(q22)inv(7)(p11q22)(22)/46,XY,del(5)(q13q31)(1)	Amplificazione EVI1	73,0	1†

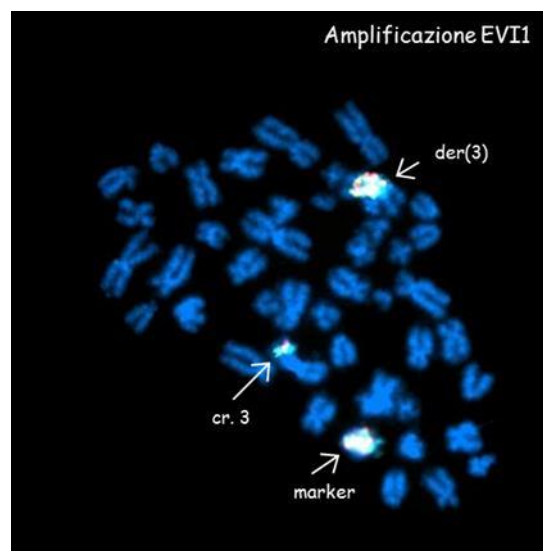
**Tabella 11. Caratteristiche dei pazienti con riarrangiamenti di EVI1.**

+ valori calcolati con primer e sonde specifici per gli esoni 15-16; † pazienti deceduti; \*pazienti sottoposti a trapianto allogenico; \*\* valore con sonde e primers specifici per gli esoni 5-6 (0.03 con sonde e primer specifici per gli esoni 15-16); NV=non valutabile; 1RBV1RV1B= riarrangiamento al 3'; 1RBV1RV1BV=riarrangiamento all'interno di EVI1; 1RBV1R1BV= riarrangiamento al 5'; 1RBV1RV2BV=riarrangiamento con amplificazione; 1RBV1R1B1V=riarrangiamento sia al 3' sia al 5'

#### 4.2.2 FISH metafasica

La FISH su metafase ha permesso di caratterizzare meglio particolari riarrangiamenti della regione 3q, identificando: 5 casi con meccanismi complessi che portavano al riarrangiamento di EVI1; 2 casi con traslocazioni criptiche, a causa della scarsa qualità del preparato; e di determinare i cromosomi coinvolti nell'amplificazione nel caso n.36 (Tab.11).

Nel caso con amplificazione di EVI1 (n.36;Tab.11), la FISH metafasica ha mostrato, in una minoranza di metafasi, un segnale di fusione corrispondente ad una copia di EVI1 sul cromosoma 3 normale e due siti di amplificazione, uno sul derivativo 3 e l'altro su un cromosoma marker (Fig.25).



**Figura 25. Amplificazione di EVI1 in FISH metafasica**

Nei 4 casi (n.30-33;Tab.11) che presentavano in CC un coinvolgimento della regione 3q21 e in I-FISH un riarrangiamento al 5' di EVI1 del tutto identico alle

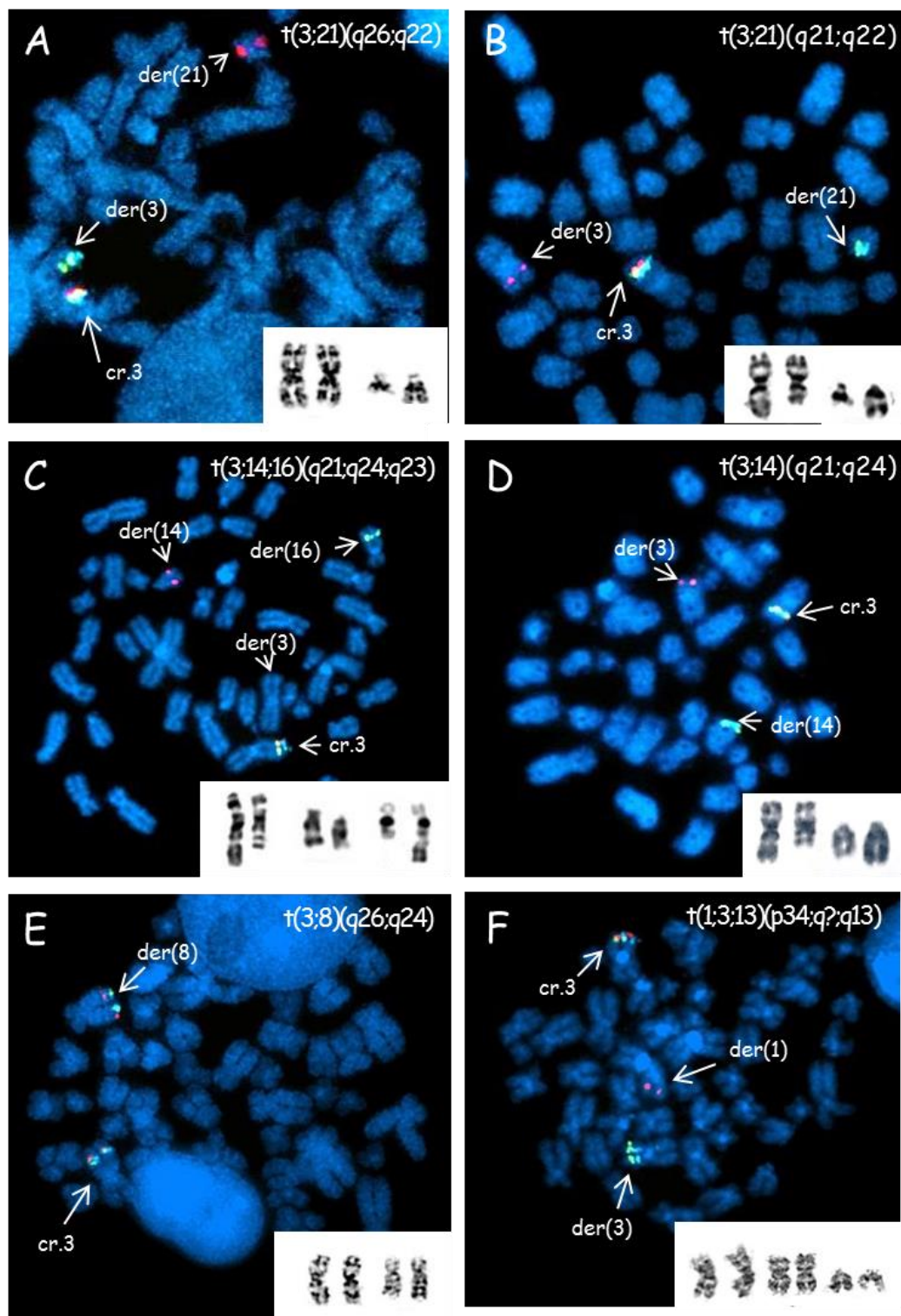


traslocazioni classiche con coinvolgimento 3q26, la FISH su metafase ha evidenziato come la porzione al 5' di EVI1, che in un riarrangiamento 'classico' è localizzata sul cromosoma partner derivativo (Fig.26A), localizzava sul derivativo 3 (Fig.26B e D). Si può ipotizzare che questo sia dovuto a due traslocazioni successive, che coinvolgono gli stessi cromosomi, ma con breakpoints diversi, che portano alla mancata visualizzazione in CC del coinvolgimento della regione 3q26, ma di una regione diversa, come 3q21. Nel caso con t(3;14;16) (n.33;Tab.11) (Fig.26C) invece il meccanismo era più complesso con il coinvolgimento di un terzo cromosoma.

Due di questi casi (n.30,31;Tab.11) presentavano una t(3;21)(q21;q22) e la I-FISH ha dimostrato il riarrangiamento di RUNX1 come avviene nella classica t(3;21)(q26;q22).

Nel caso con t(3;8)(q26;q24) (n.28;Tab.11) che in I-FISH mostrava 3 segnali separati (Fig.24D), la FISH su metafase evidenziava, al contrario, un unico segnale di fusione sul cromosoma derivativo 8, con un breakpoint più centromerico rispetto al locus di EVI1 (Fig.26E). Anche in questo caso si può ipotizzare breakpoints multipli nelle regioni 3q26 e 8q24, che portano ad una localizzazione dei tre segnali sul der(8). È probabile che la vicinanza dei breakpoints impedisca di riconoscere una diversa alternanza dei segnali che potrebbe indicare la sequenza dei breakpoints e quindi degli eventi che portano a tale riarrangiamento. Nel caso con apparente monosomia 3 in CC (n.34;Tab.11), all'interno di un cariotipo estremamente complesso, la FISH su metafase ha evidenziato una t(3;6)(q26;q25) ed una traslocazione t(3;12)(q21;p13); in questo caso era il cromosoma apparentemente normale in citogenetica ad essere

coinvolto nella t(3;6), mentre la porzione del braccio q del cromosoma omologo era coinvolto in una traslocazione sbilanciata con il cromosoma 12. Nel caso con sospetta t(1;3;13) (n.35;Tab.11) (Fig.26F) l'utilizzo di una sonda per il cromosoma 13 (13q14.3 Deletion, Aquarius® Haematology probes, Cytocell), in aggiunta alla FISH metafasica di EVI1, ha evidenziato una maggiore complessità che coinvolgeva anche la regione 3p11 con simultanea delezione del braccio p del cromosoma 3.



**Figura 26. Riarrangiamenti di EVI1 in FISH metafaseica. (A)** Riarrangiamento al 3' di EVI1 in una  $t(3;21)(q26;q21)$  'classica'. **(B), (C) e (D)** Riarrangiamenti complessi di EVI1 con coinvolgimento della banda 3q21 in CC. **(E)** Riarrangiamento complesso di EVI1 non evidenziabile in FISH metafaseica. **(F)** Riarrangiamento criptico di EVI1.

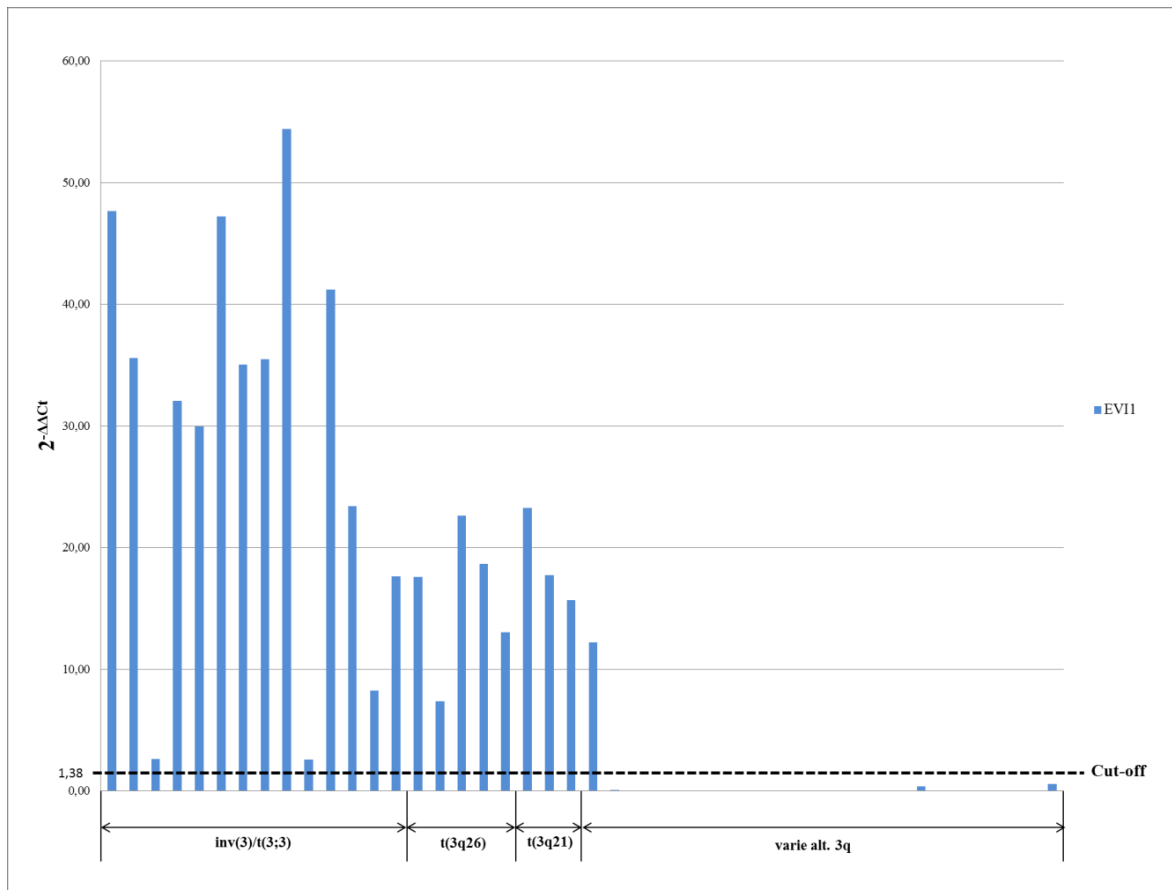
### 4.2.3 Espressione di EVI1

L'espressione di EVI1 è stata valutata in 84 pazienti distribuiti nei vari gruppi citogenetici nel seguente modo: 44 casi con alterazioni 3q (Fig.27), 34 casi con alterazioni -7/7q-, 6 casi alterazioni 1p. L'espressione di EVI1 è stata valutata con sonde e primers specifici per gli esoni 5-6 e 15-16, in tutti i casi tranne 1 (n.13;Tab.11), i due valori correlavano tra di loro.

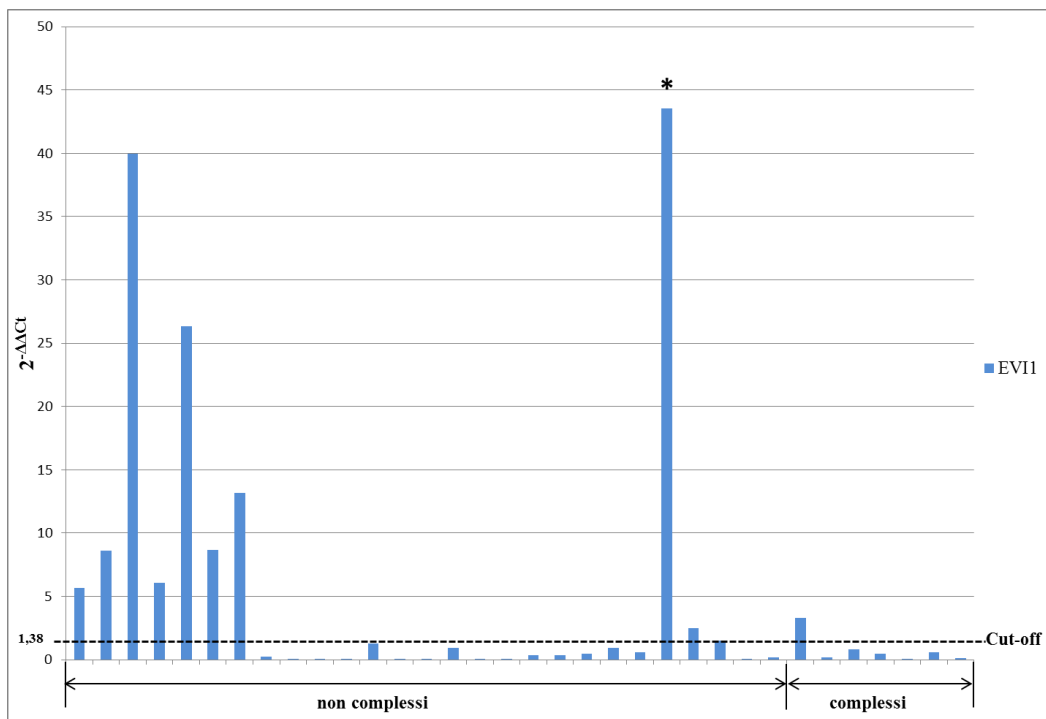
Ventitrè su 44 pazienti con alterazioni 3q mostravano un'overespressione di EVI1 (EVI1+) (Fig.27): 21 pazienti, presentavano anche in FISH il riarrangiamento di EVI1; mentre per 2 casi (n.16 e 21;Tab.11) non era più disponibile pellet citogenetico per l'ulteriore analisi in FISH. Di questi 21 pazienti, 12 appartenevano al gruppo A, 5 al gruppo B, 3 al gruppo C e 1 al gruppo D (Tab.11).

Dieci pazienti su 34 analizzati con -7/7q- erano EVI1+ (Fig.28); in FISH: 1 caso mostrava un'amplificazione di EVI1 (n.36;Tab.11); 6 casi risultavano normali e 3 casi non sono stati analizzati in quanto non era più disponibile il materiale.

Nessun paziente con alterazioni del braccio p del cromosoma 1 presentava overespressione di EVI1.



**Figura 27. Espressione di EVI1 nei casi 44 casi con alterazioni 3q**



**Figura 28. Espressione di EVI1 nei 34 pazienti con alterazioni 7q**

\* caso n 36 (Tab.11) con amplificazione di EVI1 in FISH

#### 4.2.4. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti

Dei 36 pazienti con riarrangiamenti di EVI1 confermati in FISH e/o analisi di espressione genica: 28 erano diagnosticate LAM, di cui 19 “*de novo*”, 6 secondarie ad una precedente chemioterapia, 2 ad una precedente SMD ed 1 ad una mielofibrosi (Tab.12). Il 31.6% (6 su 19 casi “*de novo*”) apparteneva al citotipo FAB M1 e il 21% (4 su 19) M4. Sette casi erano diagnosticati come SMD, di cui 3 secondarie a trattamento per un precedente linfoma non Hodgkin ed 1 ad una LAM citotipo M3; 1 paziente presentava una SMC. L’età mediana era 50 anni (16-81), 23 erano maschi e 13 femmine. Le alterazioni addizionali più frequenti erano alterazioni del cromosoma 7 presenti nel 66.7% dei casi, alterazioni del cromosoma 5 nel 16.7% dei pazienti; un cariotipo complesso era riscontrabile nel 25% dei pazienti. Ventisette dei 28 pazienti trattati con chemioterapia erano resistenti al primo ciclo di terapia di induzione, solo 5 raggiungevano una risposta citogenetica completa, di cui 4 dopo più cicli di chemioterapia, di breve durata. Pazienti con  $inv(3)/t(3;3)$  presentavano un’età inferiore, un maggior numero di piastrine rispetto ai pazienti con altri riarrangiamenti di EVI1. Alterazioni del cromosoma 7 erano molto frequenti in entrambi i gruppi, mentre alterazioni del cromosoma 5 e soprattutto cariotipi complessi si osservavano maggiormente nei pazienti con altri riarrangiamenti di EVI1. Quasi tutti i pazienti con  $inv(3)/t(3;3)$  presentavano all’esordio una LAM, mentre nei pazienti con altri riarrangiamenti erano frequenti anche SMD, soprattutto secondarie a terapie per un tumore primitivo. La mediana di sopravvivenza dei pazienti con  $inv(3)/t(3;3)$  era sfavorevole, era 14.2 mesi, con sopravvivenza ad 1 anno del 42,8% che diminuiva al 4.8% a 5 anni, anche i pazienti con altri riarrangiamenti di EVI1 mostravano una prognosi

ugualmente sfavorevole. La presenza delle alterazioni -7/7q- o altre alterazioni addizionali al riarrangiamento di EVI1 non sembrava influenzare la sopravvivenza sia considerando solo i pazienti con inv(3)/t(3;3) sia considerando tutti i pazienti con riarrangiamenti di EVI1 (Tab.12).

		<b>EVI+ n=36</b>		
		<b>inv(3)/t(3;3) n=21</b>	<b>altri riarrar. EVI1 n=15</b>	<b>p</b>
<b>Sesso (n)</b>	Maschi	12(57,1%)	11(73,3%)	n.s.
	Femmine	9 (42,9%)	4(26,7%)	
<b>Età, (anni)</b>	Mediana (range)	44 (16-68)	68 (31-81)	0,0004
<b>GB (x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana (range)	12,5 (1,3-167)	7(1,8-88)	n.s.
<b>Piastrine (x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana (range)	155(12-515)	46 (10-314)	0,05
<b>Hb (g/dl)</b>	Mediana (range)	9(4,7-12,4)	9,9(6,3-12,7)	n.s.
<b>Citogenetica (n)</b>	(-7/7q-)	14(66,7%)	10 (66,7%)	n.s.
	(-5/5q-)	2 (9,5%)	4 (26,7%)	n.s.
	cariotipo complesso	3 (14,3%)	6 (40%)	0,03
	alterazione isolata	6 (28,6%)	4 (26,7%)	n.s.
<b>LAM (n)</b>		19(90.5%)	9(60%)	0,04
<b>SMD (n)</b>		2(9,5%)	5(33.3%)	n.s.
<b>SMC (n)</b>		/	1(6.7%)	
<b>RCC (%)</b>		22.7	0	n.s.
<b>Sopravvivenza mediana</b>	mesi	14.2	9.2	n.s.
<b>Sopravvivenza totale</b>	anni			
	1	42.8%	16.7%	
	3	4.8%	8.3%	
	5	4.8%	8,3%	

**Tabella 12. Caratteristiche dei pazienti EVI1+ con inv(3)/t(3;3) e altri riarrangiamenti di EVI1.** RCC=risposta citogenetica completa, calcolata su pazienti trattati con chemioterapia convenzionale di cui era disponibile il follow-up. n.s.= non statisticamente significativo

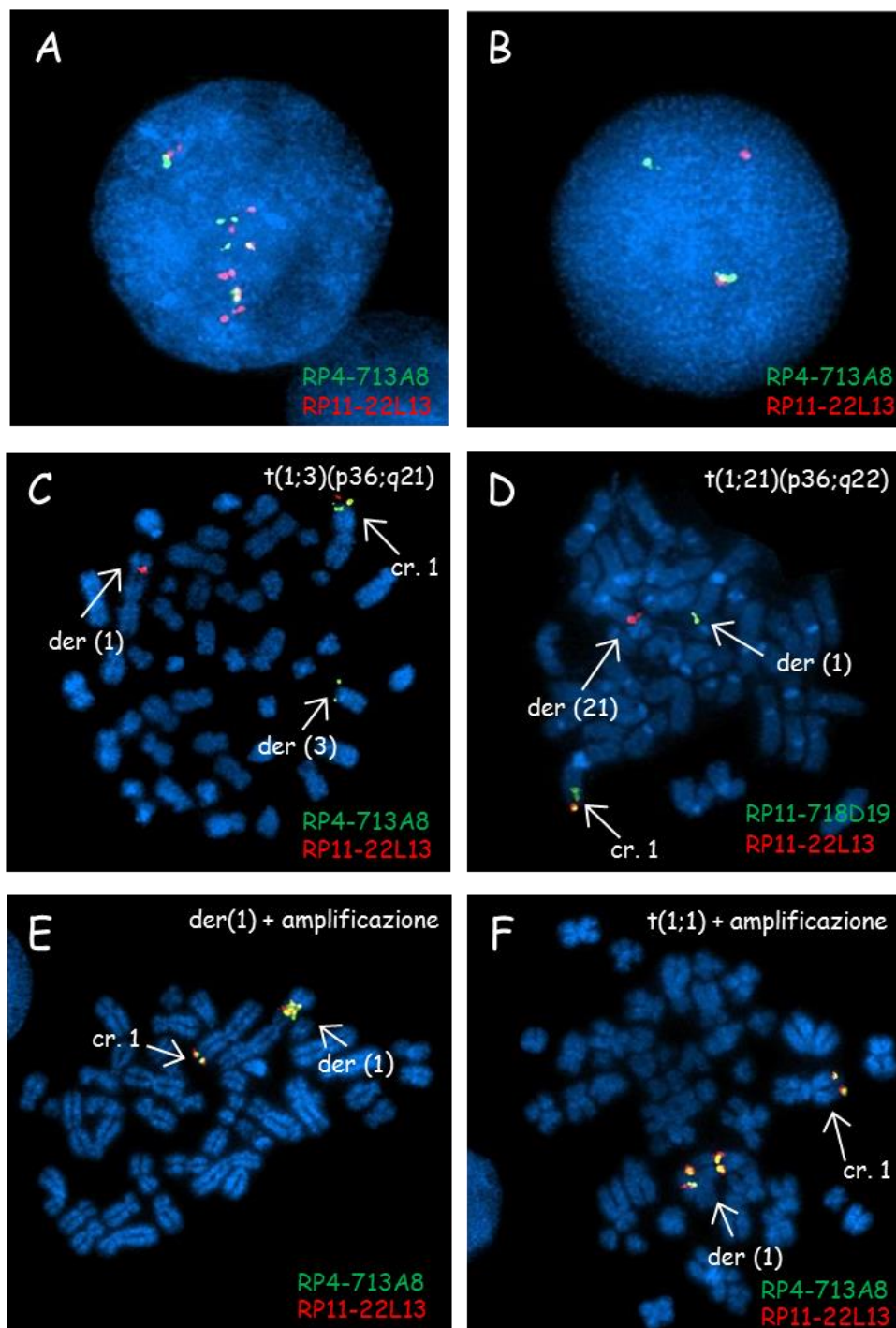
### ***4.3 Riarrangiamenti di PRDM16***

#### **4.3.1 FISH**

Nei 14 casi con alterazioni della regione 1p36, l'analisi in FISH con due diverse combinazioni di sonde BAC ha permesso di identificare 4 pazienti con riarrangiamento di PRDM16 (n.1,2,3 e 6;Tab.13). Tre di questi casi presentavano il breakpoint al 5' di PRDM16 (Fig.29B); di questi, 2 mostravano in CC una t(1;3)(p36;q21) (n.1 e 2;Tab.13)(Fig.29C); l'altro caso (n.6;Tab.13) presentava un add(1)(p36). Un solo caso presentava un breakpoint al 3' di PRDM16, e mostrava in CC una t(1;21)(p36;q22) (n.3;Tab.13) (Fig.29D). In questo caso, la FISH su metafase con la sonda AML1(RUNX1) breakapart, ha evidenziato un breakpoint più centromerico rispetto al gene RUNX1, indicato dalla presenza del segnale di fusione sul cromosoma derivativo 1. Altri 3 casi (n.4,7 e 10;Tab.13) presentavano in I-FISH un'amplificazione della regione 1p36 e PRDM16 identificata come presenza di 3-5 segnali di fusione (Fig.29A) con entrambe le combinazioni di sonde utilizzate. Per escludere che fosse un'amplificazione dell'intero braccio p abbiamo utilizzato una sonda di controllo sull'1p32 (RP11-220M1) che non ha mostrato amplificazione.

La FISH su metafase ha confermato la presenza di una traslocazione nel caso n.6 (Tab.13) con il coinvolgimento di un cromosoma partner che, per scarsità di materiale disponibile, non è stato possibile identificare. Due casi mostravano l'amplificazione della regione 1p36 e del gene PRDM16 sul cromosoma derivativo 1 (n.4 e 10;Tab.13) (Fig.29E,F). Nel caso n.7 (Tab.13), l'amplificazione avveniva su un cromosoma non identificato, a causa della scarsità di materiale residuo.





**Figura 29. Riarrangiamenti di PRDM16 in I-FISH e FISH metafaseica.**(A) Amplificazione dei segnali rosso e verde. (B) Riarrangiamento al 5' di PRDM16. (C) FISH metafaseica con riarrangiamento al 5' di PRDM16. (D) FISH metafaseica con riarrangiamento al 3' di PRDM16. (E-F) Amplificazione di PRDM16 su metafase.

N	Età	Sesso	Patologia	Cariotipo	Breakpoint sull'1p36	Conseguenze	Altri risultati	RQ-PCR (2 <sup>-2ΔΔCt</sup> ) <sub>+</sub>	Follow-up (mesi)
1	52	M	M2	46,XY,t(1;3)(p36;q21)	RP4-713A8↔RP11-22L13	sonda telomerica sul der(3)		7,24	53*in RC
2	53	M	SMDpostLNH	46,XY,t(1;3)(p36;q21)	RP4-713A8↔RP11-22L13	sonda telomerica sul der(3)			NV
3	57	F	Msec	46,XX,t(1;21)(p36;q22)/ 46,XX,t(3;21)(q26;q22)	RP11-22L13↔RP11-718D19	sonda telomerica sul der(21)	FISH RUNX1 breakpart: no riarrangiato nella t(1;21) segnale di fusione sul der(1); riarrangiato nella t(3;21) FISH EVII: riarrangiato nella t(3;21)		12
4	67	F	M1	43-45,XX,add(1)(p36),- 5,add(6)(q27),del(7)(q22),- 14,t(13;18)(q21;p11),add(17)(p13), del(20)(q11),+alt non clonali		amplificazione sul der(1)t(1;1)p36;p?)	FISH sonda di controllo 1p32: no amplificazione	61,2	17†
5		M	M0-1sec	70-85,XXY,trisomie,tetrasomie, del(1)(p36),del(1)(p36),del(2)(p23), del(5)(q13q33),del(6)(q21), del(6)(q21),del(7)(q22),	/			43,3	3†
6	52	F	MpostSMD	49,XX,add(1)(p36),del(5)(q22q35), t(7;8)(p22;q22),+8,del(9)(q13q22), add(17)(p13),+19,+21(15)/50,XX,id.+2 2(1)/48,XX,add(1p),t(7;8), t(10;10)(q24;q26),t(11;17)(q13;p13), del(13)(q14q22),+der(13)(4)	RP4-713A8↔RP11-22L13	sonda telomerica su un derivativo non identificato t(1;?)(p36;?)		39,9	44*‡
7	66	M	M4	47,XY,der(1)t(1;1)(p22;q32), del(5)(q13q33),add(17)(p13),1r,+1fa(1) 46-47,XY,der(1),3,del(5q), add(13)(p11),der(14)t(3;14)(q13;p11), add(17p),i(21)(q10),1-2r,+1fa(13)/45- 46,XY,der(1),-5,add(13p),add(17p),- 17,der(19)t(17;19)(q12;q13),i(21q)(5)		amplificazione su un cromosoma non identificato	FISH sonda di controllo 1p32: no amplificazione	8,3	6†

**Tabella 13. Caratteristiche dei pazienti con alterazioni 1p. (continua)**

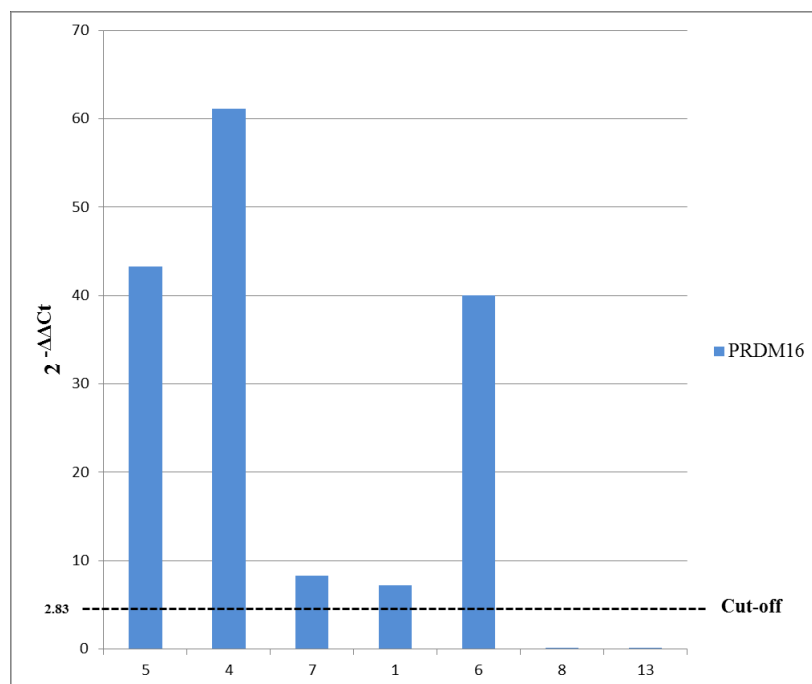
8		M	M	46,XY,dup(1)(p22p36)		no riarrangiamento; no amplificazione	0,04	9 no RC
9		M	M	46,XY,dup(1)(p22p36)		no riarrangiamento; no amplificazione		
10	64	M	M	46,XY,der(1)t(1;13),del(5)(q13q31),-7,-13,+2Ms(14)/ 45,XY,der(1)t(1;13),del(5)(q13q31),-7,i(8)(q10),-13,+M(5)/ 46,XY,der(1)t(1;13),del(5)(q13q31),del(7q),-13,+2Ms(1)/ 46,XY,der(1)t(1;13),del(5)(q13q31),del(7q),del(10p),i(11)(q10),-13,+2Ms(1)		amplificazione sul der(1)	FISH sonda di controllo 1p32: no amplificazione	1†
11	84	F	SMDsec	46,XX,t(1;4)(p36;q23),t(3;4)(q26;q25),del(5)(q13q31),del(7)(q22q32),add(19)(p13)(4)/ 44-46,XX,id.,add(12)(p13),+12Ms(13)/ 44-46,XX,id.,add(12)(p13),+1-2Ms(13) ulteriori Ms(5)	centromerico a RP11-718D19	sonda telomerica sul der(4)		1†
12	58	M	SMD	46,XY,del(1)(p32p36),+8,i(17)(p10)(16)/47,del(1)(p32p36),+8(13)	centromerico a RP11-718D19	delezione centromerica a RP11-718D19		NV
13	41	M	M	45,XY,t(1;2)(p36;q31),t(3;3)(q21;q26),der(4q),-6,del(9)(q22),del(13)(q22q34),-16,der(18q),+M, perdite random	centromerico a RP11-718D19	sonda telomerica sul der(4)	0,01	2†
14	70	M	M	46,XY,del(1)(p32p36),dup(1)(q21q44),del(13)(q14q32)	centromerico a RP11-718D19	sonda telomerica sul der(13)		NV

**Tabella 13. Caratteristiche dei pazienti con alterazioni 1p.** ↔ breakpoint tra i due BAC; + primers e sonda specifici per esoni 14-15; \* pazienti sottoposti a trapianto allogenico; RC= remissione completa; † pazienti deceduti; ‡pazienti in ricaduta dopo trapianto allogenico; NV= non valutabile

### 4.3.2 Espressione di PRDM16

L'espressione di PRDM16 è stata valutata in un totale di 74 pazienti: 7 pazienti con alterazioni citogenetiche 1p; 26 pazienti con alterazioni -7/7q-, 41 pazienti con alterazioni 3q. L'espressione di PRDM16 è stata valutata con sonde e primer specifici per gli esoni 4-5 e 14-15, i valori di espressione ottenuti con queste due combinazioni di sonde e primers erano concordi in tutti i casi analizzati.

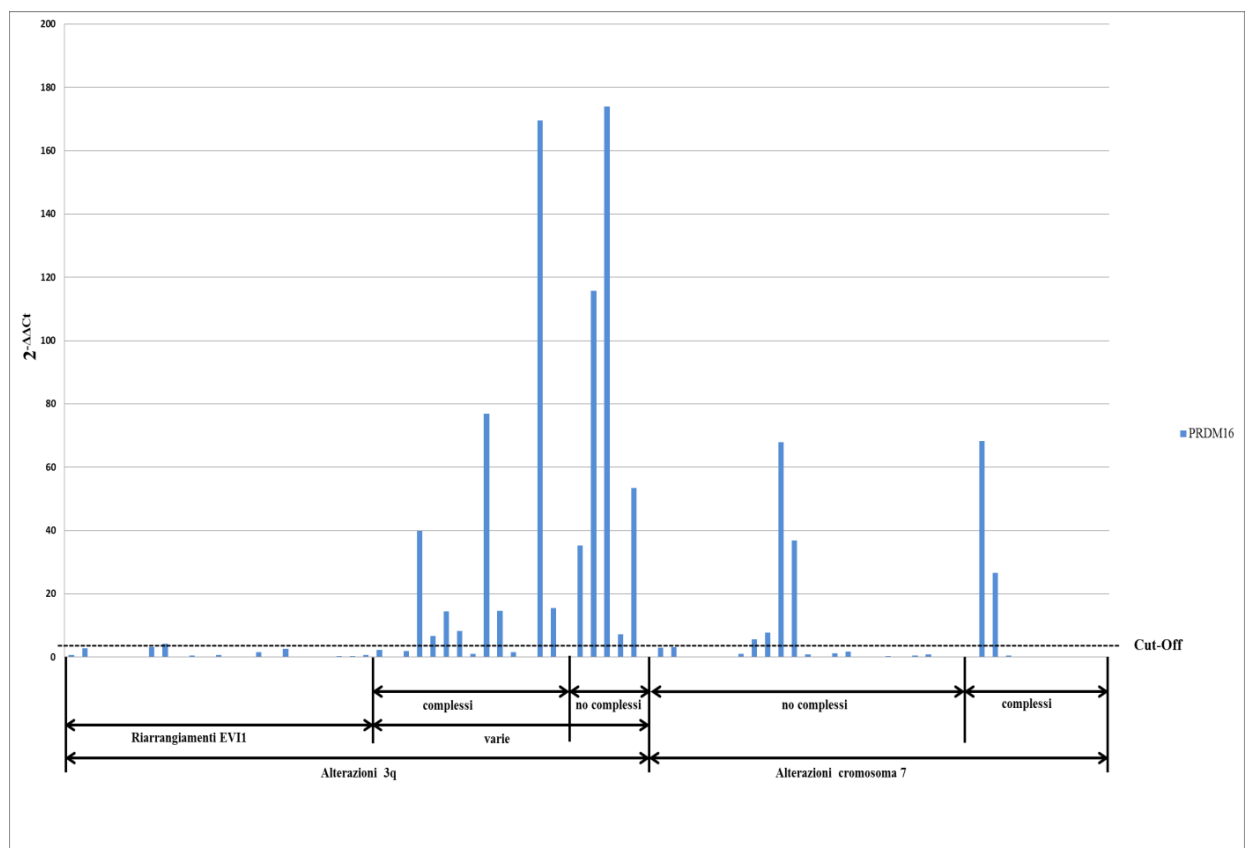
Cinque dei 7 casi (71.4%) con alterazioni citogenetiche 1p mostravano un'overespressione di PRDM16 (PRDM16+). Quattro avevano in FISH alterazioni del gene PRDM16: 2 casi con riarrangiamento (n.1 e 6;Tab.13); 2 casi con amplificazione (n.4 e 7;Tab.13), mentre non era stato possibile eseguire l'analisi in FISH nell'ultimo caso (n.5;Tab.13)(Fig.30).



**Figura 30. Espressione di PRDM16 in 7 casi con alterazioni citogenetiche 1p**

Sei casi (23%) su 26 con alterazioni citogenetiche -7/7q- erano PRDM16+, ma nessuno di questi pazienti presentava in FISH riarrangiamenti o amplificazioni di PRDM16 (Fig.31).

Infine, 14 casi (34.1%) su 41 con varie alterazioni 3q erano PRDM16+; alti livelli di espressione erano presenti in casi con cariotipi sia complessi che non complessi. In 3 casi con cariotipo complesso era presente un'amplificazione di PRDM16 (3 segnali di fusione), mentre tutti gli altri mostravano un pattern di FISH normale (Fig.31)



**Figura 31. Espressione di PRDM16 in 67 pazienti con alterazioni 3q e cromosoma 7**

### 4.3.3 Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti

Dei 25 pazienti con overespressione di PRDM16 (PRDM16+), 23 erano affetti da LAM di cui, 16 “*de novo*” e 7 secondarie; 2 da SMD, di cui una secondaria a linfoma non Hodgkin. Le caratteristiche cliniche sono riassunte nella Tabella 14.

PRDM16+ n=25		
<b>Sesso (n)</b>	Maschi	14 (56%)
	Femmine	11 (44%)
<b>Età, (anni)</b>	Mediana, (range)	57 (32-73)
<b>GB (x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana, (range)	3,6(1,2-74)
<b>Piastrine ( x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana, (range)	43(14-227)
<b>Hb (g/dl)</b>	Mediana, (range)	8,9(6,6-12,4)
<b>LAM (n)</b>		23(92%)
<b>SMD (n)</b>		2(8%)
<b>Citogenetica (n)</b>	cariotipo complesso	14(56%)
<b>RCC*</b>		50%
<b>Sopravvivenza</b>	Mediana (mesi)	14,3

**Tabella 14. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti PRDM16+.** RCC\*=Risposta citogenetica completa, calcolata su pazienti trattati con chemioterapia convenzionale di cui era disponibile il follow-up.

Dei 10 pazienti che presentavano alterazioni del gene PRDM16 in FISH, 4 mostravano un riarrangiamento e 6 un'amplificazione genica. I pazienti con riarrangiamenti avevano un'età più giovane, un solo caso presentava un cariotipo complesso e due casi erano SMD secondarie a linfoma; mentre tutti i pazienti con amplificazione genica avevano un'età più avanzata, presentavano

l'amplificazione all'interno di un cariotipo complesso con alterazioni dei cromosomi 5 e 7, ed erano tutti diagnosticati come LAM (Tab.15).

		<b>Riarrangiamenti PRDM16 n=4</b>	<b>Amplificazioni PRDM16 n=6</b>
<b>Sesso, (n)</b>	Maschi	2(50%)	4(66.7%)
	Femmine	2(50%)	2(33.3%)
<b>Età, (anni)</b>	Mediana (range)	52(48-57)	65(62-66)
<b>GB (x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana (range)	6,5(2,6-10,9)	12(1,9-22,6)
<b>Piastrine (x10<sup>9</sup>/L)</b>	Mediana (range)	41(14-133)	34(18-206)
<b>Hb (g/dl)</b>	Mediana (range)	9,2(8,8-10)	7,8(7,5-10,6)
<b>LAM (n)</b>		2(50%)	6(100%)
<b>SMD*(n)</b>		2(50%)	/
<b>Citogenetica, (n)</b>	(-7/7q-)	/	4(66,6%)
	(-5/5q-)	2(50%)	6(100%)
	cariotipo complesso	1(25%)	6(100%)
	alterazione isolata	2(50%)	/

**Tabella 15. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti con riarrangiamenti o amplificazioni di PRDM16.**

\*secondarie a linfoma

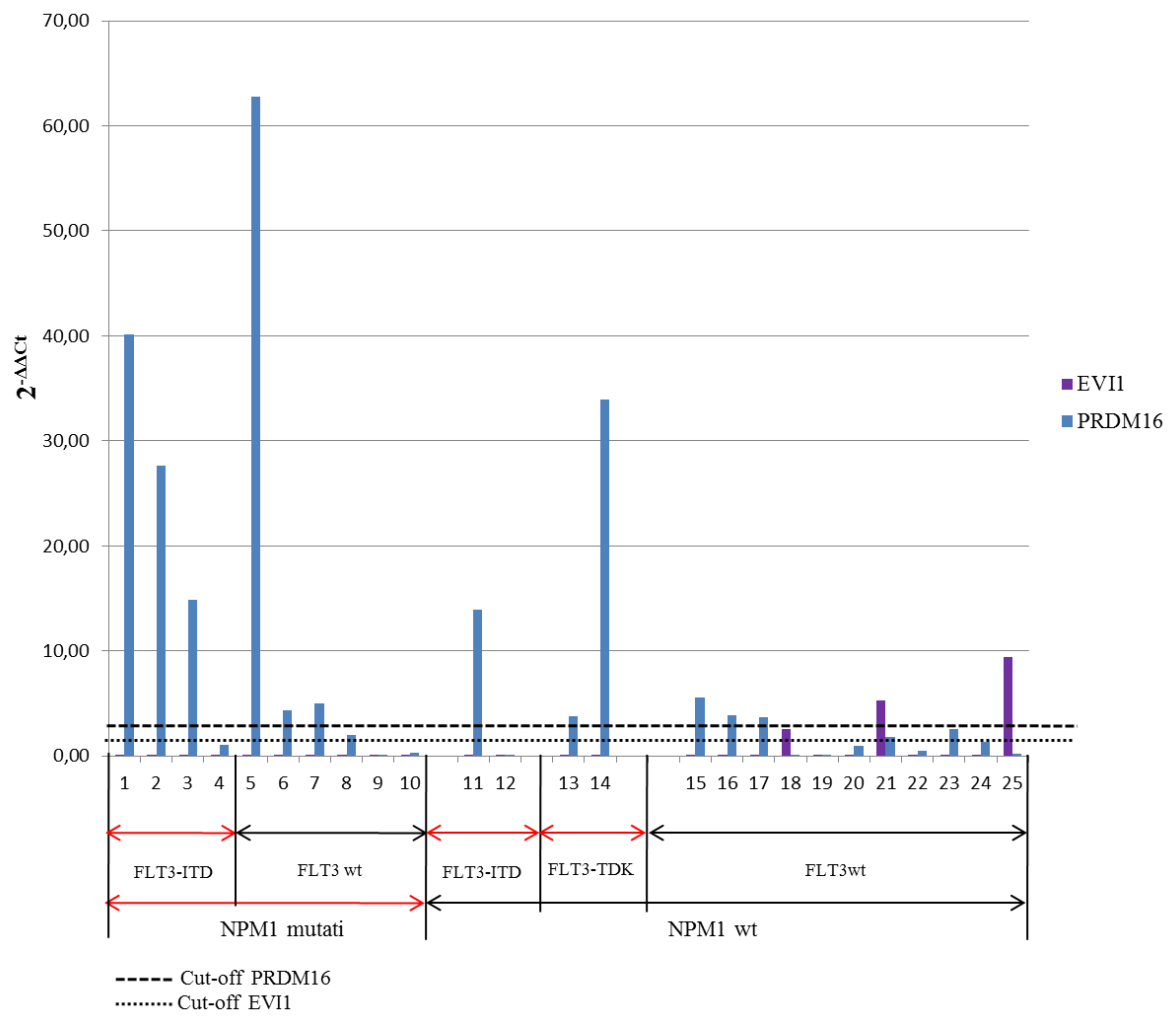
#### ***4.4 Espressione di PRDM16 ed EVI1 in LAM-CN***

L'espressione di PRDM16 ed EVI1 è stata inoltre valutata in 25 pazienti con LAM-CN. Alti livelli di PRDM16 sono stati descritti in un elevato numero di pazienti (12/25; 50%), mentre solo 3 mostravano un'overespressione di EVI1 (3/25; 12%). Abbiamo quindi valutato in FISH se riarrangiamenti criptici o amplificazioni geniche potessero essere i meccanismi alla base dell'overespressione, ma in nessuno di questi pazienti sono stati osservati amplificazioni o riarrangiamenti.

Nei pazienti LAM-CN con alta espressione di PRDM16: 54.5% aveva mutazioni di NPM1, 36,6% mutazioni FLT3-ITD, 27.3% erano positivi per entrambe le mutazioni, mentre 18.2% avevano FLT3-TDK. (Fig.32). Queste percentuali non differivano in modo statisticamente significativo rispetto a quelle dei pazienti con bassi livelli di PRDM16.

I pazienti che esprimevano alti livelli di EVI1 erano tutti FLT3 e NPM1 wild-type.





**Figura 32. Espressione di PRDM16 ed EVI1 in 25 LAM-CN**

## 5. DISCUSSIONE

Alla diagnosi, le alterazioni citogenetiche delle regioni cromosomiche 3q26 e 1p36 sono rare (1-2%) ma ricorrenti nelle sindromi mieloproliferative, in particolare nelle LAM e nelle SMD, spesso secondarie a chemioterapia o, nel caso di LAM, secondarie a SMD [30,58,62,83,84]. Si osservano con minore frequenza anche in casi di leucemia mieloide cronica in fase accelerata o in crisi blastica, o in altre sindromi mieloproliferative croniche [33,35,37,84,102]. I principali geni target di tali riarrangiamenti sono EVI1 e PRDM16, localizzati, rispettivamente nelle regioni cromosomiche 3q26 e 1p36. I due geni presentano un elevato grado di omologia e appartengono alla stessa famiglia genica definita ‘PRDM protein’ di cui fanno parte altri 15 membri (tra cui: PRDM2/RIZ e Prdm9, importanti regolatori della cromatina; Prdm1/Blimp e Prdm14, fattori di trascrizione coinvolti nel differenziamento cellulare) tutti caratterizzati dalla presenza di un dominio PR all’N-terminale, simile al dominio SET che caratterizza un gruppo di proteine ad attività metil-trasferasica. Recentemente è stato dimostrato come EVI1 e PRDM16, attraverso quest’attività, fossero fondamentali per il mantenimento dell’integrità dell’eterocromatina e della lamina nucleare [106]. EVI1 e PRDM16 sono due fondamentali regolatori dell’emopoiesi normale, sono coinvolti nel mantenimento del pool di cellule staminali favorendo il self-renewal e inibendo il differenziamento. L’espressione di entrambi è progressivamente spenta lungo il differenziamento sino ad essere espressi a bassissimi livelli nelle cellule mature [74,104].

La deregolazione dell’espressione di EVI1 e PRDM16 è stata osservata in sindromi mieloidi in presenza di traslocazioni cromosomiche della regione 3q26 e

1p36. In questi pazienti la trascrizione dei due geni è posta sotto il controllo di sequenze regolatorie di geni espressi ubiquitariamente o in specifici lineage, causando un'espressione aberrante, che è il meccanismo responsabile della leucemogenesi. Le traslocazioni più frequenti associate ai riarrangiamenti di EVI e PRDM16 sono rispettivamente l'inv(3)/t(3;3) e t(1;3)(p36;q21); in entrambe il gene partner coinvolto è RPN1 [30,84]. Le LAM e SMD associate a inv(3)/t(3;3) condividono alcune caratteristiche cliniche, quali normale o elevato numero di piastrine, displasia multilineare nel midollo con presenza di megacariociti atipici, scarsa risposta alla terapia e prognosi sfavorevole [57,62].

Anche per i riarrangiamenti di PRDM16 ed, in particolare, per la t(1;3)(p36;q21) (la più frequente), è descritta una prognosi sfavorevole [84] ed alcuni studi riportano caratteristiche cliniche simili a quelle della inv(3)/t(3;3). Gli studi su PRDM16 sono però ancora scarsi e poco conclusivi. Sebbene i riarrangiamenti bilanciati delle regioni 3q26 e 1p36 possano essere facilmente identificati tramite CC, la localizzazione distale li rende geni candidati per coinvolgimenti criptici soprattutto in presenza di materiale con scarsa morfologia [43,101-103]. Data la prognosi particolarmente sfavorevole diventa importante confermare la presenza di alterazioni di tali geni.

Nella nostra casistica di LAM, le alterazioni 3q e inv(3)/t(3;3) avevano frequenza paragonabile a quelle riportate in letteratura. Suddividendo in due periodi di tempo la nostra casistica, abbiamo osservato come vi siano stati cambiamenti nelle frequenze di alcuni gruppi citogenetici. In particolare, nel secondo periodo, vi è stato un aumento della frequenza dei cariotipi normali e dei cariotipi complessi ed una diminuzione della frequenza di t(15;17). Per quanto riguarda le

alterazioni nel sito di EVI1 c'è stata una diminuzione della frequenza di  $inv(3)/t(3;3)$  ma contemporaneamente un aumento di riarrangiamenti di EVI1 diversi dalla  $inv(3)/t(3;3)$  (da 0.4% ad 1,6%  $p<0.05$ ). L'aumento dell'età media riscontrata nel secondo periodo potrebbe essere un fattore che influenzava queste variazioni essendo noto come alcune alterazioni, tra cui proprio il cariotipo complesso, siano associate ad una età più avanzata.

Lo scopo principale del nostro studio è stato quello di identificare e caratterizzare tramite analisi in FISH e analisi di espressione genica alterazioni di EVI1 e di PRDM16 in pazienti con sindromi mieloproliferative. Abbiamo identificato 35 casi con riarrangiamento e/o overespressione di EVI1 su 70 casi con alterazioni 3q. La maggioranza (82.9%) presentava, alterazioni della regione 3q26 in CC, mentre il 17.1% dei casi, più inaspettatamente, mostrava in CC alterazioni in regioni cromosomiche diverse, principalmente 3q21. In questi casi, la FISH su metafase ha permesso di identificare meccanismi complessi: 2 o più traslocazioni cromosomiche successive che coinvolgevano la regione 3q con breakpoint diversi, oppure alterazioni criptiche (Fig.26). La presenza di multipli breakpoints era ancora più evidente nel caso  $t(3;8)(q26;q24)$  (Fig.24D e Fig.26E), in cui il pattern in FISH interfase era compatibile con diversi breakpoints molto ravvicinati nella regione di EVI1 tanto da non essere evidenziati in FISH su metafase. E' possibile ipotizzare una fragilità cromosomica in questi siti e in particolare nel locus di EVI1 che li rende suscettibili a rotture multiple. Inoltre un 27% di pazienti con traslocazioni localizzate in 3q26 mediante CC, non mostrava un coinvolgimento di EVI1 ad indicare che non necessariamente alterazioni di questa regione cromosomica sono associate a riarrangiamenti di EVI1. Abbiamo

osservato un'ottima correlazione tra FISH e RQ-PCR: in tutti i pazienti che mostravano un riarrangiamento in FISH, era rilevabile l'overespressione di EVI1. La FISH ha il vantaggio di poter identificare il riarrangiamento anche in presenza di trascritti varianti, mentre con la RQ-PCR è necessario utilizzare combinazioni di sonde e primers diversi per poter identificare tutti i trascritti, come nel caso n.13 (Tab.11), che non mostrava overespressione utilizzando la combinazione primers/sonda per gli esoni 15-16, mentre era overespresso con la combinazione per gli esoni 5-6. Questi dati indicano come sia importante ai fini di una corretta valutazione dei riarrangiamenti di EVI1 utilizzare sia la FISH interfaseica che metafaseica in pazienti con alterazioni 3q26, ma anche coinvolgenti altre regioni del braccio q del cromosoma 3.

Dopo l'inv(3)/t(3;3), presente nel 58.3% dei pazienti con riarrangiamento di EVI1, l'alterazione più frequente nella nostra casistica era la t(3;21)(q26;q22) (11%), le restanti erano alterazioni singole; alcune già riportate in letteratura, mentre altre non erano state descritte in precedenza, tra cui: t(1;3)(q32;q36) (n.26;Tab.11), una traslocazione complessa che coinvolgeva i cromosomi 1, 3 e 13 (n.35;Tab.11), t(3;14)(q21;q24) (n.32;Tab.11) e t(3;14;16)(q21;q24;q24) (n.33;Tab.11). La t(1;3) compariva in un paziente trattato per LAM citotipo M3; contemporaneamente l'aspirato midollare presentava aspetti mielodisplastici con presenza di megacariociti atipici. La FISH per la t(15;17)(q22;q21), che era presente alla diagnosi di M3, risultava negativa, mentre era presente il riarrangiamento di EVI1 valutato in FISH e confermato dall'overespressione in RQ-PCR. Il citotipo M3 è l'unico citotipo non associato, in letteratura, a riarrangiamenti di EVI1; sono stati descritti solo 2 casi di LAM secondarie a M3, senza t(15;17), con t(3;21) e

riarrangiamento di EVI1 [107,108].

Due pazienti che presentavano due nuove traslocazioni:  $t(3;14)(q21;q24)$  e  $t(3;14;16)(q21;q24;q24)$  (n. 32 e 33; Tab.11), erano fratelli.

Tali traslocazioni non sono state descritte precedentemente in letteratura, ed il coinvolgimento di una stessa regione cromosomica (14q24), suggeriva che si potesse trattare di un caso di LAM familiare con stesso riarrangiamento di EVI1, in cui una probabile alterazione genetica ereditaria avesse favorito l'acquisizione del riarrangiamento. Sono state descritte mutazioni in GATA2 in 4 famiglie con ricorrenza di LAM, e mutazioni in RUNX1 sono state identificate in famiglie con disordini piastrinici con tendenza a progredire in LAM [109,110]. Recentemente è stato riportato un caso, simile al nostro, di madre e figlia diagnosticate con LAM con  $inv(3)$  e monosomia 7, supportando l'ipotesi che la presenza di una mutazione genetica ereditaria possa favorire l'acquisizione dei riarrangiamenti di EVI1 [111]. Come riportato in letteratura, anche nella nostra casistica l'alterazione addizionale più frequente nei pazienti con riarrangiamento di EVI era l'alterazione del cromosoma 7 (in particolare monosomia 7), che era presente nel 66.7% dei pazienti. Data questa stretta associazione e la descrizione in letteratura di traslocazioni criptiche di EVI in pazienti con  $-7/7q-$  [43], abbiamo esteso l'analisi di espressione genica e di FISH ad un gruppo di 58 pazienti con alterazioni del cromosoma 7, in assenza di alterazioni della regione cromosomica 3q. Un paziente su 51 (1.8%) analizzati in FISH ha mostrato un'amplificazione di EVI1, localizzata sul cromosoma derivativo 3 e su un cromosoma marker (non identificato), in un clone (50% delle cellule analizzate) non evidenziato in CC; la rivalutazione del cariotipo ha permesso di individuare l'amplificazione di EVI1

in metafasi con scarsa morfologia. L'amplificazione genica era quindi un altro meccanismo responsabile dell'overespressione di EVI1 che è stato riportato in soli pochi casi in letteratura [112,113]. Questo paziente presentava un'elevata espressione di EVI1 come altri 9 pazienti (26.5%) con alterazioni 7q, in 6 di questi pazienti la FISH non ha però evidenziato alterazioni di EVI1. Nella nostra casistica quindi alterazioni 'criptiche' di EVI1 erano rare, e quando presenti erano 'nascoste' dalla scarsa morfologia del preparato citogenetico. Invece, l'overespressione di EVI1, in assenza di riarrangiamenti era osservata nel gruppo con alterazioni del cromosoma 7, come già descritto in letteratura [17]. I meccanismi che portano all'overespressione in questi casi non sono stati ancora chiariti; è stato suggerito il coinvolgimento di meccanismi epigenetici.

La stretta associazione tra EVI1 e monosomia 7 depone a favore della presenza di un gene oncosoppressore che coopera con EVI1 nell'indurre la trasformazione leucemica. Quale sia questo gene candidato, o il legame tra queste due alterazioni, non è chiaro; studi recenti ipotizzano l'instaurarsi, in seguito all'attivazione di EVI1, di un'instabilità genomica che determina l'acquisizione della monosomia 7 e la transizione da una fase mielodisplastica ad una fase acuta, poiché EVI1 da solo non sembra in grado di indurre una LAM [77,80]. Inoltre, altri recenti studi sembrano confermare il ruolo di EVI1 nell'instabilità genomica [114]. In alcuni dei nostri casi (11%) l'alterazione del cromosoma 7 era presente in un clone secondario, o non era più presente dopo chemioterapia, mentre rimaneva il clone con la sola alterazione di EVI1; questi eventi depongono a favore di un'acquisizione secondaria dell'alterazione del cromosoma 7. In realtà la sequenza di eventi non era sempre chiara; infatti, in due casi (n.17 e 36;Tab.11),

le alterazioni del cromosoma 7 precedevano l'acquisizione del riarrangiamento/amplificazione di EVI1; è interessante notare come in entrambi i casi fosse presente una delezione del 5q, che era la seconda alterazione più frequente (16.7%) associata ai riarrangiamenti di EVI1 e che precedeva l'acquisizione delle alterazioni 7q. È possibile che in questi pazienti fosse presente un'instabilità precedente che abbia favorito l'acquisizione di diverse alterazioni, tra cui il riarrangiamento di EVI1, che probabilmente ha determinato la progressione in fase acuta, ed ulteriore instabilità. La frequenza di cariotipi complessi alla diagnosi di pazienti con riarrangiamenti di EVI1 era 18%, una percentuale bassa che non sembrava concordare con il ruolo di EVI1 nel generare instabilità. Questa percentuale sale ad un 40% se consideriamo anche i cariotipi osservati al momento della ricaduta della malattia o della resistenza alla terapia. Quest'osservazione potrebbe confermare l'instabilità generata da EVI1, probabilmente in alcuni casi non identificabile alla diagnosi, in quanto presente in piccoli cloni che diverranno solo successivamente dominanti e responsabili della resistenza o della ricaduta della malattia. Per confermare questa ipotesi sarebbe necessario individuare la presenza di questi piccoli cloni alla diagnosi.

I pazienti con  $\text{inv}(3)/\text{t}(3;3)$  si caratterizzavano per un'età più giovane, un elevato numero di piastrine e globuli bianchi, e per la frequente displasia dei megacariociti (60.9%). La prognosi di questi pazienti era sfavorevole, con una mediana di sopravvivenza di 14,2 mesi ed una sopravvivenza totale ad un anno del 42,8% che scendeva al 4.8% a 3 e a 5 anni. Questi pazienti erano spesso refrattari alla chemioterapia e solo il 22.7% raggiungeva una remissione citogenetica completa, spesso dopo più cicli di chemioterapia. I pazienti con



riarrangiamenti EVI1, che non avevano inv(3)/t(3;3), mostravano alcune caratteristiche in comune al gruppo inv(3)/t(3;3), come una ridotta sopravvivenza, una scarsa risposta alla terapia ed una stretta associazione con alterazioni del cromosoma 7, mentre si differenziavano per un'età più elevata, un numero di piastrine inferiore e una maggior frequenza di alterazioni del cromosoma 5. Alcune di queste caratteristiche potrebbero essere associate ad una maggior frequenza di SMD soprattutto secondarie a terapia. La presenza di alterazioni addizionali, come alterazioni 7q, non sembrava influenzare la sopravvivenza totale, suggerendo che la sola presenza di un riarrangiamento di EVI1 predica una prognosi sfavorevole.

Alterazioni della regione 1p erano rare, ma la maggior parte di esse (57.1%), coinvolgeva PRDM16; 3 casi presentavano un riarrangiamento al 5' di PRDM16, mentre in un caso il riarrangiamento era al 3' del gene. Questo riarrangiamento è stato osservato in una t(1;21)(p36;q22), descritta in letteratura associarsi al riarrangiamento di PRDM16 e di RUNX1 [99]. Nel nostro caso RUNX1 non era coinvolto, poiché traslocava completamente sul cromosoma derivativo 1. Purtroppo non è stato possibile valutare l'espressione di PRDM16 in RQ-PCR. Nel 40% dei casi il meccanismo che determinava l'overespressione di PRDM16 era l'amplificazione genica (Fig.29A, E e F). L'amplificazione di PRDM16 è già stata descritta in tumori gastrici [91], mentre nelle patologie ematologiche non è stata riportata in precedenza, anche perché gli studi sono ancora pochi; l'overespressione è stata invece riportata in casi senza coinvolgimenti della regione 1p36, in particolare nei gruppi citogenetici a prognosi sfavorevole e cariotipo normale. Abbiamo quindi esteso l'analisi di espressione ad altri gruppi

della nostra casistica, quali alterazioni 3q, alterazioni 7q e in 25 LAM-CN. L'overespressione di PRDM16 era un evento frequente nei diversi gruppi citogenetici presi in esame: 50% nelle LAM-CN, 34.1% nel gruppo con alterazioni 3q e 23% nel gruppo -7/7q-. Nella nostra casistica di LAM-CN, le mutazioni di NPM1 e FLT3, sebbene fossero più frequenti in pazienti con overespressione di PRDM16, non differivano in modo statisticamente significativo dai casi senza overespressione, contrariamente ad uno studio [93] che ne riportava una maggiore frequenza, statisticamente significativa, nei pazienti con overespressione di PRDM16. La nostra è, però, una piccola casistica e quest'associazione andrebbe confermata in un gruppo più numeroso di pazienti. Nella maggioranza dei casi, l'espressione aberrante di PRDM16 in assenza di coinvolgimenti in CC della regione 1p36, non era imputabile ad alterazioni genetiche (riarrangiamenti o amplificazioni), in 3 casi si associava ad acquisizione di una copia del gene. Abbiamo osservato come frequentemente pazienti che esprimevano alti livelli di PRDM16 avevano un cariotipo complesso (56%); in 6 casi (24%) era presente un'amplificazione criptica in CC (3-5 copie del gene), ma evidenziata in FISH, che poteva essere il meccanismo che ne determinava l'overespressione. Inoltre abbiamo confrontato per ogni paziente, nei 99 casi in cui è stato possibile, i livelli di espressione genica di PRDM16 ed EVI1, e abbiamo rilevato come l'overespressione dei due geni fosse mutualmente esclusiva, e solo raramente (2 casi) fossero contemporaneamente overespressi. In particolare, alti livelli di espressione di PRDM16 si associavano a bassi livelli di espressione di EVI1. Ovviamente, questi sono dati preliminari che dovrebbero essere confermati in una casistica più ampia e in differenti gruppi citogenetici, per

cercare di comprendere il ruolo di PRDM16 e il rapporto tra i due geni, alla luce di un recente studio che indica EVI1 tra i geni target di PRDM16 [104].

Indubbiamente la casistica dei pazienti che presentavano alterazioni genetiche di PRDM16 (amplificazioni o riarrangiamenti) era limitata, però abbiamo potuto osservare che i pazienti con riarrangiamento mostravano un'età inferiore, un'associazione con cariotipo non complesso, ed erano sia LAM sia SMD secondarie. L'unico caso con cariotipo complesso nel gruppo dei casi con riarrangiamenti di PRDM16, era una paziente (n.6;Tab.13) in cui la valutazione citogenetica era stata possibile solo in ricaduta di malattia; la FISH per PRDM16 aveva, però, già evidenziato la presenza del riarrangiamento alla diagnosi. Non è possibile perciò escludere che la complessità osservata in ricaduta sia il risultato di un'evoluzione clonale successiva. Al contrario, l'amplificazione di PRDM16 era sempre associata a cariotipi complessi e ad una diagnosi di LAM “*de novo*”. Pazienti con alterazioni di PRDM16 avevano una prognosi sfavorevole, con una mediana di sopravvivenza di 14.3 mesi, il 50% dei pazienti raggiungeva una risposta citogenetica completa, ma di breve durata.

Il nostro studio dimostra come l'utilizzo della FISH permetta di identificare pazienti con riarrangiamenti e amplificazioni dei geni EVI1 e PRDM16, anche in assenza di un coinvolgimento visibile in CC delle regioni interessate, poiché mascherato da riarrangiamenti complessi, o a causa della scarsa qualità del preparato citogenetico; mentre l'utilizzo della RQ-PCR consenta di identificare anche i casi in cui l'overespressione non sia dovuta ad alterazioni geniche. È importante confermare con FISH o RQ-PCR il coinvolgimento di questi due geni, soprattutto per quanto riguarda EVI1 in presenza di alterazioni 3q e alterazioni 7q

e per PRDM16 in presenza di alterazioni 1p, per individuare, alla diagnosi, pazienti con una prognosi sfavorevole e che quindi potranno beneficiare di terapie maggiormente aggressive o di trapianto allogenico di cellule staminali.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. *"Lezioni di Ematologia"* VI° edizione, Esculapio Editore, 2003.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* *"Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group."* Br J Haematol 1976; 33: 451-8.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* *"Proposed criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group."* Ann Intern Med 1985; 103: 620-5.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, *et al.* *"World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997."* J Clin Oncol. 1999;17(12):3835-49.
5. Jaffe ES, Lee Harris N, Harald S, *et al.* *"World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues."* IARC Press 2001, Lyon.
6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, *et al.* *"The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes."* Blood. 2009;114(5):937-51.
7. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. *"Cytogenetics in acute leukemia."* Blood Rev. 2004;18(2):115-36
8. Döhner H, Estey EH, Amadori S, *et al.* *"Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet."* Blood. 2010;115(3):453-74.

9. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, *et al.* "Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials." *Blood*. 2010;116(3):354-65.
10. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, *et al.* "Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461)." *Blood*. 2002;100(13):4325-36
11. Bacher U, Kern W, Schnittger S, *et al.* "Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia." *Haematologica* 2005;90:1502-1510.
12. Fröhling S, Skelin S, Liebisch C, *et al.* "Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia." *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2480-5.
13. Fröhling S, Kayser S, Mayer C, *et al.* "Diagnostic value of fluorescence in situ hybridization for the detection of genomic aberrations in older patients with acute myeloid leukemia." *Haematologica*. 2005;90(2):194-9
14. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. "Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications." *J Clin Oncol*. 2011;29(5):475-86.
15. Grimwade D, Hills R.K. "Independent prognostic factors for AML outcome" *Hematolgy Am Soc Hematol Educ Program* 2009;385- 395.
16. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, *et al.* "Monosomal karyotype

*in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype.*” J Clin Oncol. 2008;26(29):4791-7.

17. Gröschel S, Lugthart S, Schlenk RF, et. Al. “*High EVII expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities.*” J Clin Oncol. 2010;28(12):2101-7.

18. Orozco JJ, Appelbaum FR. ”*Unfavorable, complex, and monosomal karyotypes: the most challenging forms of acute myeloid leukemia.*” Oncology (Williston Park) 2012;26(8):706-12.

19. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. ”TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome.” Blood. 2012;119(9):2114-21

20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. “*Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.*” Br J Haematol. 1982;51(2):189-99.

21. Haase D. “*Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes.*” Ann Hematol. 2008;87(7):515-26.

22. Boultonwood J, Pellagatti A, McKenzie AN, et al. “*Advances in the 5q-syndrome.*” Blood. 2010;116(26):5803-11.

23. Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M, et al. “*Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients.*” Leukemia. 2003;17(11):2107-12

24. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. “*International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.*” Blood. 1997;89(6):2079-88.

25. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, *et al.* “World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with *de novo* primary myelodysplastic syndromes.” *Br J Haematol.* 2007;137(3):193-205
26. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, *et al.* “Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes.” *Blood.* 2012;120(12):2454-65.
27. Schanz J, Tüchler H, Solé F, *et al.* “New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge.” *J Clin Oncol.* 2012;30(8):820-9
28. List A, Dewald G, Bennett J, *et al.* “Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion.” *N Engl J Med.* 2006;355(14):1456-65.
29. Charrin C, Belhabri A, Treille-Ritouet D, *et al.* “Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features.” *Hematol J.* 2002;3(1):21-31
30. Lugthart S, Gröschel S, Beverloo HB, *et al.* “Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type *inv*(3)(q21q26.2)/*t*(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia.” *J Clin Oncol.* 2010;28(24):3890-8
31. Martinelli G., Ottaviani E., Buonamici S, *et al.* “Association of 3q21q26 syndrome with different *RPN1/EVI1* fusion transcript.” *Haematologica* 2003; 88:1221-1228.



32. Levy E.R., Parganas K., Morishita K., *et al.* “*DNA Rearrangements Proximal to EVI1 locus Associated With the 3q21q26 Syndrome*” *Blood* 1994; 83:1348-1354
33. Poppe B, Dastugue N, Vandesompele J, *et al.* “*EVI1 is Consistently Expressed as Principal Transcript in Common and Rare 3q26 Rearrangements*” *Genes, Chromosome and Cancer* 2006; 45:349-356
34. Wieser R. “*Rearrangements of chromosome band 3q21 in myeloid leukemia.*” *Leuk Lymphoma*. 2002 Jan;43(1):59-65
35. Mitani K, Ogawa S, Tanaka T, *et al* “*Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia.*” *EMBO J.* 1994;13(3):504-510
36. Nucifora G, Begy C.R, Kobayashi H, *et al.* “*Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations.*” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(9):4004-8
37. Peeters P, Wlodarska I, Baens M, *et al.* “*Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders*”. *Cancer Res.* 1997;57(4):564-9
38. Secker-Walker L.M, Mehta A, Bain B. “*Abnormalities of 3q21 and 3q26 in myeloid malignancies: A United Kingdom Cancer Cytogenetics Group study.*” *Br J Haematol.* 1995; 91:490-501
39. Stevens-Kroef M, Poppe B, van Zelderen-Bhola S, *et al.* “*Translocation t(2;3)(p15-23;q26-27) in myeloid malignancies: report of 21 new cases, clinical, cytogenetic and molecular genetic features.*” *Leukemia.* 2004;18(6):1108-14

40. De Weer A, Speleman F, Cauwelier B, *et al.* "EVII overexpression in *t(3;17)* positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EVII to the MSI2 locus at 17q22." *Haematologica*. 2008;93(12):1903-7.
41. Lennon PA, Abruzzo LV, Medeiros LJ, *et al.* "Aberrant EVII expression in acute myeloid leukemias associated with the *t(3;8)(q26;q24)*." *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;177(1):37-42
42. Storlazzi CT, Anelli L, Albano F, *et al.* "A novel chromosomal translocation *t(3;7)(q26;q21)* in myeloid leukemia resulting in overexpression of EVII." *Ann Hematol*. 2004;83(2):78-83
43. Haferlach C, Bacher U, Grossmann V, *et al.* "Three novel cytogenetically cryptic EVII rearrangements associated with increased EVII expression and poor prognosis identified in 27 acute myeloid leukemia cases." *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(12):1079-85
44. Moir DJ, Jones PA, Pearson J, *et al.* "A new translocation, *t(1;3) (p36;q21)*, in myelodysplastic disorders." *Blood*. 1984;64(2):553-5
45. Mucenski ML, Taylor BA, Ihle JN, *et al.* "Identification of a common ecotropic viral integration site, *Evi-1*, in the DNA of AKXD murine myeloid tumors." *Mol Cell Biol*. 1988;8(1):301-8
46. Wieser R. "The oncogene and developmental regulator EVII: expression, biochemical properties, and biological functions." *Gene*. 2007;396(2):346-57
47. Métais JY, Dunbar CE. "The MDS1-EVII gene complex as a retrovirus integration site: impact on behavior of hematopoietic cells and implications for gene therapy." *Mol Ther*. 2008;16(3):439-49
48. Yatsula B, Lin S, Read AJ, *et al.* "Identification of binding sites of EVII

*in mammalian cells.*" J Biol Chem. 2005;280(35):30712-22

49. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, *et al.* "*Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression.*" EMBO J. 2005;24(11):1976-87

50. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N, *et al.* "*Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells.*" Oncogene. 2009;28(49):4364-74

51. Buonamici S, Li D, Mikhail FM, *et al.* "*EVII abrogates interferon-alpha response by selectively blocking PML induction.*" J Biol Chem. 2005;280(1):428-36

52. Kurokawa M, Mitani K, Irie K, *et al.* "*The oncoprotein Evi-1 represses TGF- beta signalling by inhibiting Smad3.*" Nature. 1998;394(6688):92-6

53. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, *et al.* "*The evi-1 oncoprotein inhibits c- Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death.*" EMBO J. 2000;19(12):2958-68

54. Yoshimi A, Kurokawa M. "*Evi1 forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways.*" Oncotarget. 2011;2(7):575-86

55. Fears S, Mathieu C, Zeleznik-Le N, *et al.* "*Intergenic splicing of MDS1 and EVII occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family.*" Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(4):1642-7

56. Derunes C, Briknarová K, Geng L, *et al.* "*Characterization of the PR domain of RIZ1 histone methyltransferase.*" Biochem Biophys Res Commun. 2005;333(3):925-34

57. Morishita K. "Leukemogenesis of the *EVII/MEL1* gene family." *Int J Hematol.* 2007;85(4):279-86
58. Wei Cui, Jianlan Sun, Claudiu V. *et al.* "Myelodysplastic Syndrome With *inv(3)(q21q26.2)* or *t(3;3)(q21;q26.2)* Has a High Risk for Progression to Acute Myeloid Leukemia." *Am J Clin Pathol* 2011;136:282-288
59. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Basinko A, *et al.* "Conventional cytogenetics and breakpoint distribution by fluorescent *in situ* hybridization in patients with malignant hemopathies associated with *inv(3)(q21;q26)* and *t(3;3)(q21;q26)*." *Anticancer Res.* 2011;31(10):3441-8
60. Suzukawa K, Taki T, Abe T, *et al.* "Identification of translocational breakpoints within the intron region before the last coding exon (exon 12) of the *EVII* gene in two cases of CML-BC with *inv(3)(q21q26)*." *Genomics.* 1997;42(2):356-60
61. Morishita K, Parganas E, William CL, *et al.* "Activation of *EVII* gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3937-41
62. Testoni N, Borsaru G, Martinelli G, *et al.* "3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features." *Haematologia* 1999;84:690-694
63. Sun J, Konoplev SN, Wang X, *et al.* "De novo acute myeloid leukemia with *inv(3)(q21q26.2)* or *t(3;3)(q21;q26.2)*: a clinicopathologic and cytogenetic study of an entity recently added to the WHO classification." *Mod Pathol.* 2011;24(3):384-9.

64. Suzukawa K, Parganas E, Gajjar A, *et al.* "Identification of a breakpoint cluster region 3' of the ribophorin I gene at 3q21 associated with the transcriptional activation of the EVI1 gene in acute myelogenous leukemias with inv(3)(q21q26)." Blood. 1994;84(8):2681-8
65. Rubin CM, Larson RA, Anastasi J, *et al.* "t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia." Blood. 1990;76(12):2594-8
66. Cameron Yin C, Cortes J, Barkoh B, *et al.* "t(3;21)(q26;q22) in myeloid leukemia: an aggressive syndrome of blast transformation associated with hydroxyurea or antimetabolite therapy." Cancer 2006;106:1730–8
67. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, *et al.* "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:10431–4
68. De Braekeleer E, Férec C, De Braekeleer M. "RUNX1 translocations in malignant hemopathies." Anticancer Res. 2009;29(4):1031-7
69. Kumano K, Kurokawa M. "The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells." J Cell Physiol. 2010;222(2):282-5
70. T Tanaka, K Mitani, M Kurokawa, *et al.* "Dual functions of the AML1/Evi-1 chimeric protein in the mechanism of leukemogenesis in t(3;21) leukemias." Mol Cell Biol. 1995; 15(5): 2383–2392
71. Mitani K. "Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1." Oncogene. 2004;23(24):4263-9
72. Voutsadakis IA, Maillard N. "Acute myelogenous leukemia with the t(3;12)(q26;p13) translocation: case report and review of the literature." Am J

Hematol. 2003;72(2):135-7

73. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F, *et al.* “*ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review.*” Leuk Res. 2012;36(8):945-61

74. Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, *et al.* “*Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity.*” J Exp Med. 2011;208(12):2403-16

75. Yuasa H, Oike Y, Iwama A, *et al.* “*Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression*” EMBO J. 2005;24(11):1976-87

76. Zhang Y, Stehling-Sun S, Lezon-Geyda K, *et al.* “*PR-domain-containing Mds1- Evi1 is critical for long-term hematopoietic stem cell function.*” Blood. 2011;118(14):3853-61

77. Buonamici S, Li D, Chi Y, *et al.* “*EVII induces myelodysplastic syndrome in mice*”. J Clin Invest. 2004;114(5):713-9

78. Goyama S, Kurokawa M. “*Evi-1 as a critical regulator of leukemic cells.*” Int J Hematol. 2010;91(5):753-7

79. Knudson AG. “*Two genetic hits (more or less) to cancer.*” Nat Rev Cancer. 2001;1(2):157-62

80. Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, *et al.* “*Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVII activation after gene therapy for chronic granulomatous disease.*” Nat Med. 2010;16(2):198-204

81. Gröschel S, Schlenk RF, Engelmann J, *et al.* “*Deregulated expression of*

*EVII defines a poor prognostic subset of MLL-rearranged acute myeloid leukemias: a study of the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group and the Dutch-Belgian- Swiss HOVON/SAKK Cooperative Group.*” J Clin Oncol. 2013;31(1):95-103

82. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Löwenberg B, *et al.* “Low expression of *MDS1-EVII-like-1 (MEL1)* and *EVII-like-1 (EL1)* genes in favorable-risk acute myeloid leukemia.” Exp Hematol. 2003;31(11):1066-72

83. Duhoux FP, Ameye G, Lambot V, *et al.* “Refinement of *1p36* alterations not involving *PRDM16* in myeloid and lymphoid malignancies.” PloS One. 2011;6(10):e26311

84. Duhoux FP, Ameye G, Montano-Almendras CP, *et al.* “*PRDM16 (1p36)* translocations define a distinct entity of myeloid malignancies with poor prognosis but may also occur in lymphoid malignancies.” Br J Haematol. 2012;156(1):76-88

85. Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, *et al.* “A novel gene, *MEL1*, mapped to *1p36.3* is highly homologous to the *MDS1/EVII* gene and is transcriptionally activated in *t(1;3)(p36;q21)*-positive leukemia cells.” Blood. 2000;96(9):3209-14

86. Nishikata I, Sasaki H, Iga M, *et al.* “A novel *EVII* gene family, *MEL1*, lacking a PR domain (*MEL1S*) is expressed mainly in *t(1;3)(p36;q21)*-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation.” Blood. 2003 Nov 1;102(9):3323-32

87. Lahortiga I, Agirre X, Belloni E, *et al.* “Molecular characterization of a *t(1;3)(p36;q21)* in a patient with MDS. *MEL1* is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the *t(1;3)* cells.” Oncogene. 2004;23(1):311-6

88. Kajimura S, Seale P, Tomaru T, *et al.* "Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex." *Genes Dev.* 2008;22(10):1397-409
  
89. Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, *et al.* "Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation." *Oncogene.* 2011;30(40):4194-207.
  
90. Kajimura S, Seale P, Kubota K, *et al.* "Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex." *Nature.* 2009;460(7259):1154-8
  
91. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, *et al.* "SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells." *J Biol Chem* 2009; 284(5):3334-44
  
92. Seale P, Bjork B, Yang W, *et al.* "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." *Nature.* 2008;454(7207):961-7
  
93. Shing DC, Trubia M, Marchesi F, *et al.* "Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice." *J Clin Invest.* 2007;117(12):3696-707
  
94. Storlazzi CT, Albano F, Guastadisegni MC, *et al.* "Upregulation of MEL1 and FLJ42875 genes by position effect resulting from a t(1;2)(p36;p21) occurring during evolution of chronic myelomonocytic leukemia." *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40(3):452-5
  
95. Shimizu S, Suzukawa K, Koder T, *et al.* "Identification of breakpoint cluster regions at 1p36.3 and 3q21 in hematologic malignancies with



*t(1;3)(p36;q21).*” Genes Chromosomes Cancer. 2000;27(3):229-38

96. Xinh PT, Tri NK, Nagao H, *et al.* “*Breakpoints at 1p36.3 in three MDS/AML(M4) patients with t(1;3)(p36;q21) occur in the first intron and in the 5' region of MEL1.*” Genes Chromosomes Cancer. 2003;36(3):313-6

97. Rippe V, Drieschner N, Meiboom M, *et al.* “*Identification of a gene rearranged by 2p21 aberrations in thyroid adenomas.*” Oncogene. 2003;22(38):6111-4

98. Stevens-Kroef MJ, Schoenmakers EF, van Kraaij M, *et al.* “*Identification of truncated RUNX1 and RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a case of t(1;21)(p36;q22)-positive therapy-related AML.*” Leukemia. 2006;20(6):1187-9

99. Sakai I, Tamura T, Narumi H, *et al.* “*Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22).*” Genes Chromosomes Cancer. 2005;44(3):265-70

100. Hazourli S, Chagnon P, Sauvageau M, *et al.* “*Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias.*” Genes Chromosomes Cancer. 2006;45(11):1072-6

101. Deluche L, Joha S, Corm S, *et al.* “*Cryptic and partial deletions of PRDM16 and RUNX1 without t(1;21)(p36;q22) and/or RUNX1-PRDM16 fusion in a case of progressive chronic myeloid leukemia: a complex chromosomal rearrangement of underestimated frequency in disease progression?*” Genes Chromosomes Cancer. 2008;47(12):1110-7

102. Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, *et al.* “*RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance.*” Blood. 2008;111(7):3735-41

103. Quentin S, Cuccuini W, Ceccaldi R, *et al.* “*Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions.*” *Blood*. 2011;117(15):e161-70
104. Aguilo F, Avagyan S, Labar A, *et al.* “*Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells.*” *Blood*. 2011;117(19):5057-66
105. Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga J, *et al.* “*Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells.*” *Blood*. 2004;103(7):2753-60
106. Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, *et al.* “*Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity.*” *Cell*. 2012;150(5):948-60.
107. Park TS, Choi JR, Yoon SH, *et al.* “*Acute promyelocytic leukemia relapsing as secondary acute leukemia with translocation t(3;21)(q26;q22) and RUNX1-MDS1-EV11 fusion transcript.*” *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;187(2):61-73
108. Miyazaki H, Ino T, Sobue R, *et al.* “*Translocation (3;21)(q26;q22) in treatment- related acute leukemia secondary to acute promyelocytic leukemia.*” *Cancer Genet Cytogenet*. 1994;74(2):84-6
109. Bödör C, Renneville A, Smith M, *et al.* “*Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival.*” *Haematologica*. 2012;97(6):890-4
110. Ganly P, Walker LC, Morris CM. “*Familial mutations of the transcription factor RUNX1 (AML1, CBFA2) predispose to acute myeloid leukemia.*” *Leuk*

Lymphoma. 2004;45(1):1-10

111. Lawrie A, Stevenson DA, Doig TN, *et al.* “*Acute myeloid leukemia presenting in a mother and daughter pair with the identical acquired karyotypic abnormality consisting of inversion 3q21q26 and monosomy 7: a review of possible mechanisms.*” *Cancer Genet.* 2012;205(11):599-602

112. Grygalewicz B, Woroniecka R, Pastwińska A, *et al.* “*Acute panmyelosis with myelofibrosis with EVI1 amplification.*” *Cancer Genet.* 2012;205(5):255-60

113. Thiel A, Beier M, Ingenhag D, *et al.* “*Comprehensive array CGH of normal karyotype myelodysplastic syndromes reveals hidden recurrent and individual genomic copy number alterations with prognostic relevance.*” *Leukemia.* 2011;25(3):387-99

114. Karakaya K, Herbst F, Ball C, *et al.* “*Overexpression of EVI1 interferes with cytokinesis and leads to accumulation of cells with supernumerary centrosomes in G0/1 phase.*” *Cell Cycle.* 2012;11(18):3492-503